UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

DENISE TORNAVOI DE CASTRO

**Efeito da incorporação de vanadato de prata nanoestruturado na
atividade antimicrobiana, propriedades mecânicas e morfologia
de resinas acrílicas**

Ribeirão Preto

2014

DENISE TORNAVOI DE CASTRO

**Efeito da incorporação de vanadato de prata nanoestruturado na
atividade antimicrobiana, propriedades mecânicas e morfologia
de resinas acrílicas**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia
de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de Mestre no Programa de
Reabilitação Oral.

Área de Concentração: Reabilitação Oral

Orientadora: Profa Dra Andréa Cândido dos Reis

Ribeirão Preto

2014

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Elaborada pela Biblioteca Central do Campus da USP - Ribeirão Preto

de Castro, Denise Tornavoi

Efeito da incorporação de vanadato de prata nanoestruturado na atividade antimicrobiana, propriedades mecânicas e morfologia de resinas acrílicas. Ribeirão Preto, 2014.

119 p.: il.; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Reabilitação Oral.

Orientadora: Cândido dos Reis, Andréa.

1.Resina acrílica. 2.Microbiologia. 3.Dureza superficial. 4.Rugosidade superficial. 5.Resistência à flexão. 6.Resistência à compressão. 7.Resistência ao impacto. 8.Nanotecnologia. 9.Caracterização microestrutural

FOLHA DE APROVAÇÃO

Denise Tornavoi de Castro

Efeito da incorporação de vanadato de prata nanoestruturado na atividade antimicrobiana, propriedades mecânicas e morfologia de resinas acrílicas

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre no Programa de Reabilitação Oral.

Área de Concentração: Reabilitação Oral

Data da defesa: ____/____/2014

Banca Examinadora

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

Á Deus pela sua presença constante, por ter me dado condições de lutar e alcançar meus objetivos.

*Aos meus queridos pais **Dilton Adorno Tornavoi** e **Rosangela Cremonezzi Tornavoi** por não medirem esforços para investir na minha educação, sendo os grandes responsáveis por eu estar aqui. Agradeço por estarem sempre ao meu lado me mostrando o caminho certo a seguir e me oferecendo suporte nos momentos necessários.*

*À minha irmã **Danielle Cremonezzi Tornavoi** pela amizade, incentivo, preocupação e companheirismo.*

*Ao meu esposo **Roberto Sérgio de Castro** pelo amor, companheirismo e incentivo. Obrigada por estar sempre ao meu lado e sonhar junto a mim, alegrando-se nos momentos felizes e tendo paciência nos momentos difíceis.*

Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, FORP-USP, representada pelo Diretor Prof. Dr. Valdemar Mallet da Rocha Barros, pelo apoio em minha formação como Cirurgiã-Dentista e pela oportunidade de realização do meu curso de mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, pelo auxílio concedido para a realização do trabalho, por meio dos processos nº 2012/09124-1 (Projeto Auxílio) e 2012/09347-0 (Bolsa de Mestrado).

*À Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Reabilitação Oral, **Profa. Dra. Fernanda de Carvalho Panzeri Pires-de-Souza** por sua competência, dedicação e incansável busca pela excelência do programa.*

*Aos **Professores do Departamento de Materiais Dentários e Prótese** por toda a contribuição em minha formação.*

*Ao **Prof. Dr. Evandro Watanabe** pela dedicação, apoio e ensinamentos essenciais para o desenvolvimento do trabalho.*

*À **Profa. Dra. Cláudia Helena Lovato da Silva** por sua atenção, disponibilidade e sugestões.*

*Ao **Prof. Dr. Raphael Freitas de Souza** por ter ajudado em momentos que precisei.*

*Ao **Prof. Dr. Oswaldo Luiz Alves** e seus alunos **Raphael Dias Holtz** e **Mateus Simões**, pela recepção em seu laboratório e ensinamentos na parte prática da síntese do nanomaterial.*

*Ao **Prof. Dr. Marco Antonio Schiavon** sempre bem disposto e pronto para ajudar no que for preciso.*

Ao Prof. Dr. José Augusto Marcondes Agnelli por ter auxiliado em parte da pesquisa.

Ao Prof. Dr. Sérgio Akira por ceder gentilmente o laboratório de Bioquímica Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP para realização de parte da pesquisa.

Às funcionárias da secretaria de Pós-Graduação e do Departamento de Materiais Dentários e Prótese, pela disposição e suporte oferecido durante o curso.

À funcionária Viviane de Cássia Oliveira, com quem passei grande parte do tempo. Pela sua dedicação, competência e momentos de aprendizado.

Aos técnicos do Laboratório Integrado de Pesquisas em Biocompatibilidade de Materiais Edson Volta e Ricardo Antunes, pela disposição, auxílio em parte dos ensaios da pesquisa e, sobretudo pela preocupação em nos oferecer o melhor ambiente de trabalho.

Ao funcionário Hermano Teixeira Machado pelos serviços de fotografia prestados.

À técnica Elizabete Rosa por auxiliar grandemente nas análises de microscopia confocal a laser.

Aos alunos de Iniciação científica Ana Paula Dias Moreno, Geyson Galo da Silva, Carla Larissa Vidal e Lígia Mariotto pela convivência e oportunidade de trabalharmos juntos.

Ao Prof. Dr. César Penazzo Lepri por estar sempre disposto a ajudar.

Ao Renato Luiz Siqueira pela colaboração na execução do projeto, disponibilidade e competência.

Aos meus colegas de curso Raony Môlin, Karen Pintado, Marta Esquerre, Flavia Coimbra e Nathalia Oliscovitz pelos momentos de convivência.

*Um agradecimento especial à minha amiga **Mariana Lima da Costa Valente**, pela convivência diária, pela paciência, carinho e união, por compartilhar comigo os momentos de alegria e de tristeza.*

*À **Acecil®** pelos trabalhos de esterilização das amostras.*

*À **Clássico Artigos Odontológico®** por ceder parte dos materiais utilizados no estudo.*

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização do meu trabalho.

Muito Obrigada

Agradecimentos Especiais

À Profa. Dra. Andréa Cândido dos Reis pela confiança e oportunidade de trabalharmos juntas. Muito obrigada pela sua presença como orientadora e acima de tudo como amiga. Agradeço por preocupar-se com meu futuro e pelos ensinamentos e colaboração na minha formação pessoal e profissional.

Muito Obrigada

Epígrafe

“As nuvens mudam sempre de posição, mas são sempre nuvens no céu. Assim devemos ser todo dia, mutantes, porém leais com o que pensamos e sonhamos; lembre-se, tudo se desmancha no ar, menos os pensamentos”.

(Paulo Beleki)

Sumário

Resumo	11
Abstract.....	13
1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1 Tipos de resinas acrílicas e composição	21
2.2 Aderência de micro-organismos em resinas acrílicas	21
2.3 Polímeros com atividade antimicrobiana	23
2.4 Nanopartículas e materiais à base de prata como agentes antimicrobianos	27
2.5 Técnicas empregadas na análise de biofilmes	31
2.6 Técnicas empregadas para avaliação das propriedades mecânicas	34
2.7 Análises morfológicas e química dos materiais	39
3. PROPOSIÇÃO	41
4. MATERIAL E MÉTODO	43
4.1 Material.....	44
4.2 Método.....	44
4.2.1 Síntese do Vanadato de Prata Nanoestruturado.....	44
4.2.2 Caracterização do Vanadato de Prata Nanoestruturado	45
4.2.3 Determinação da concentração inibitória mínima do nanomaterial	46
4.2.4 Confecção dos espécimes	46
4.2.5 Padronização da rugosidade	50
4.2.6 Esterilização.....	51
4.2.7 Avaliação da atividade antimicrobiana.....	51
4.2.8 Ensaios mecânicos	58
4.2.9 Ensaios de caracterização físico-química	61
5. RESULTADOS	62
6. DISCUSSÃO	80
7. CONCLUSÕES	88
8. REFERÊNCIAS	90
9. APÊNDICE	106

Resumo

CASTRO, D.T. **Efeito da incorporação de vanadato de prata nanoestruturado na atividade antimicrobiana, propriedades mecânicas e morfologia de resinas acrílicas.** Ribeirão Preto, 2014. **119 p.** Dissertação (Mestrado em Reabilitação Oral) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

Materiais odontológicos inovadores que apresentem propriedades antimicrobianas são altamente desejáveis na cavidade oral. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana do vanadato de prata nanoestruturado (β -AgVO₃) incorporado em duas resinas acrílicas frente a *Candida albicans*, *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, além de examinar as propriedades mecânicas e o padrão de incorporação do nanomaterial nas resinas. O nanomaterial foi caracterizado por difração de raios X (DRX), espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIV), análise elementar por energia dispersiva (EDS) e microscopia eletrônica de varredura (MEV). As propriedades antimicrobianas das resinas acrílicas incorporadas com diferentes porcentagens de β -AgVO₃ foram investigadas pelo método de redução do XTT, unidades formadoras de colônias (UFC) e microscopia confocal à laser e o comportamento mecânico por meio de ensaios de dureza e rugosidade superficial, resistência à flexão, à compressão e ao impacto. O padrão de incorporação do β -AgVO₃ nas resinas foi analisado por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e análise elementar por energia dispersiva (EDS). Os dados foram analisados por ANOVA, Tukey e pelo teste Generalized Linear Models ($\alpha=0,05$). Para ambas as resinas, em relação ao grupo controle, a incorporação de 5% e 10% de β -AgVO₃ reduziram significativamente a atividade metabólica de *C. albicans* e *P. aeruginosa* ($p<0,05$), enquanto que para *S. mutans* houve redução significativa apenas com a incorporação de 10% ($p<0,05$). Não houve diferença na atividade metabólica pelo método do XTT frente a *S. aureus* ($p>0,05$). Para ambas as resinas, observou-se uma redução significativa no número de UFC/mL de *C. albicans* para o grupo incorporado com 10% de β -AgVO₃ e de *S. mutans* para os grupos com 2,5%, 5% e 10% do nanomaterial ($p<0,05$). Para *S. aureus* e *P. aeruginosa*, houve redução significativa com a incorporação de 5% e 10% ($p<0,05$). A dureza superficial da resina termopolimerizável permaneceu inalterada pela incorporação do nanomaterial ($p>0,05$) e da autopolimerizável aumentou com 0,5% ($p<0,05$). Concentrações maiores que 1% promoveram redução na resistência flexural das resinas ($p<0,05$) enquanto que a rugosidade superficial permaneceu inalterada ($p>0,05$). A resistência à compressão da resina autopolimerizável permaneceu inalterada ($p>0,05$) e da termopolimerizável reduziu com a incorporação de 0,5% e 10% ($p<0,05$). As concentrações de 5% e 10% promoveram redução significativa na resistência ao impacto das resinas, em relação ao controle ($p<0,05$). A caracterização das resinas quanto a dispersão da carga utilizada mostrou a presença de domínios de β -AgVO₃ ao longo da matriz polimérica seguindo um padrão circular. Conclui-se que o método proposto foi capaz de promover atividade antimicrobiana às resinas acrílicas frente aos micro-organismos avaliados, sendo a mesma dependente da concentração do nanomaterial. Porém, alterações na dispersão do β -AgVO₃ na matriz dos polímeros são necessárias para não sacrificar as propriedades mecânicas e para potencializar o efeito antimicrobiano.

Palavras-chave: 1.Resina acrílica. 2.Microbiologia. 3.Dureza superficial. 4.Rugosidade superficial. 5.Resistência à flexão. 6.Resistência à compressão. 7.Resistência ao impacto. 8. Nanotecnologia. 9. Caracterização microestrutural.

Abstract

CASTRO, D.T. **Effect of the incorporation of nanostructured silver vanadate in antimicrobial activity, mechanical properties and morphology of acrylic resins.** Ribeirão Preto, 2014. **119 p.** Dissertation (Master's Degree in Oral Rehabilitation) - Ribeirão Preto School of Dentistry, University of São Paulo.

Innovative dental materials that have antimicrobial properties are highly desirable in the oral cavity. The aim of this study was to evaluate the antimicrobial activity of nanostructured silver vanadate (β -AgVO₃) incorporated into two acrylic resins against *Candida albicans*, *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*, while examining the mechanical properties and the pattern of nanomaterial incorporation into resins. The nanomaterial was characterized by X-ray diffraction (XRD), infrared spectroscopy Fourier transform (FTIR), elemental analysis by energy dispersive (EDS) and scanning electron microscopy (SEM). The antimicrobial properties of acrylic resins incorporated with different percentages of β -AgVO₃ were investigated by the reduction of XTT method, colony forming units (CFU) and confocal laser microscopy and the mechanical behavior through hardness, surface roughness, flexural, compression and impact tests. The pattern of incorporation of β -AgVO₃ resins was analyzed by scanning electron microscopy (SEM) and elemental analysis by energy dispersive (EDS). Data were analyzed by ANOVA, Tukey test and the Generalized Linear Models ($\alpha = 0.05$). For both resins, compared to the control group, the incorporation of 5% and 10% β -AgVO₃ caused a significantly reduced in the metabolic activity of *C. albicans* and *P. aeruginosa* ($p < 0.05$), while for *S. mutans* significant reduction was observed only with the incorporation of 10% ($p < 0.05$). There was no difference in metabolic activity by XTT method against *S. aureus* ($p > 0.05$). For both resins, there was a significant reduction in the number of CFU / mL for *C. albicans* incorporated group with 10% β -AgVO₃ and *S. mutans* in groups with 2.5%, 5% and 10% of nanomaterial ($p < 0.05$). For *P. aeruginosa* and *S. aureus*, there was a significant decrease with the incorporation of 5% to 10% ($p < 0.05$). The surface hardness of the heat-cured resin was unchanged by the incorporation of the nanomaterial ($p < 0.05$) and increased self-cured with 0.5% ($p < 0.05$). Concentrations above 1% promote the reduction in flexural strength of the resins ($p < 0.05$) while the surface roughness remained unchanged ($P > 0.05$). The compressive strength of the self-cured resin remained unchanged ($P > 0.05$) and heat-cured reduced with the incorporation of 0.5% and 10% ($p < 0.05$). Concentrations of 5% and 10% caused a significant reduction in impact strength of resins, compared to control ($p < 0.05$). The characterization of the resins as the dispersion of the filler used showed the presence of β -AgVO₃ domains along the polymer matrix following a circular pattern. It was concluded that the proposed method was able to promote antimicrobial activity to acrylic resins against microorganisms evaluated, with the same concentration dependent of the nanomaterial. However, changes in the β -AgVO₃ dispersion in the polymer matrix are necessary to do not sacrifice the mechanical properties and to enhance the antimicrobial effect.

Keywords: 1.Acrylic resin. 2.Microbiology. 3.Surface hardness. 4.Surface roughness. 5.Flexural strength. 6.Compressive strength. 7.Impact strength. 8.Nanotechnology. 9.Microstructural characterization.

1 Introdução

Avanços no campo da saúde refletem na melhoria da qualidade e aumento da expectativa de vida. Consequentemente, o grupo de pessoas com idade superior a sessenta anos é uma parcela crescente da população mundial. Problemas de saúde e adaptações ao novo estilo de vida tornaram-se uma realidade para a qual os profissionais de saúde devem estar preparados (Oms, 2002; Antunes et al., 2014).

A preocupação com esse grupo populacional torna-se evidente também por parte dos profissionais da odontologia. Embora medidas preventivas tenham levado à redução do número de dentes perdidos em indivíduos adultos, ainda é grande o número de edentados total ou parcial (Moreira et al., 2005; Silva; Souza, 2006; Munhoz; Abreu, 2011) assim, a demanda por aparelhos protéticos deverá aumentar devido ao rápido crescimento da população idosa (Takahashi et al., 2014). Dados do Ministério da Saúde mostram que oito milhões de pessoas ainda precisam de prótese dentária no Brasil (Brasil, 2005).

Resinas acrílicas são muito utilizadas na confecção de próteses removíveis, próteses sobre implantes, próteses provisórias e próteses maxilofaciais intra-orais, bem como guias cirúrgicos e placas oclusais (Sivakumar et al., 2013). Geralmente são compostas por polimetacrilato de metila (PMMA) e têm sido utilizadas na confecção de aparelhos protéticos desde o final de 1930 por ser um material de fácil manuseio e processamento, ajuste preciso, não necessitar de equipamentos especiais, apresentar estética adequada, baixo custo e baixa densidade (Cunha et al., 2009; Straioto et al., 2010; Rodriguez et al., 2013; Sivakumar et al., 2013).

Porém, apesar das próteses odontológicas apresentarem um melhor desempenho clínico ao longo dos anos, uma variedade de problemas como cárie, doenças periodontais e mucosites limitam a longevidade e o sucesso do tratamento reabilitador (Wady et al., 2012; Valentini et al., 2013; Takahashi et al., 2014). O crescimento microbiano e a formação de biofilme são responsáveis por estes problemas e consistem em fatores de risco significativos para infecções oportunistas em indivíduos idosos (Queiroz et al., 2013; Takahashi et al., 2014). No entanto, as resinas acrílicas não impedem a colonização microbiana e formação de biofilme, pelo contrário, estudos demonstram que estes polímeros favorecem o acúmulo de micro-organismos em sua superfície (Sivakumar et al., 2013; Jackson et al., 2014).

Além da característica inerente do material ao qual as próteses odontológicas são confeccionadas, apresentando superfície porosa e rugosa, outros fatores locais favorecem a deposição e formação do biofilme dentre eles, a ausência de carga iônica na superfície, interação hidrofóbica e eletrostática, fixação mecânica, a falta de higiene e uso contínuo da

prótese, condições de temperatura e pH constantes no meio bucal, assim como fatores sistêmicos que incluem o diabetes mellitus, quadros de imunocompressão e xerostomia (Santos et al., 2013; Rodriguez et al., 2013; Sivakumar et al., 2013).

Uma grande diversidade de micro-organismos é frequentemente encontrada na superfície de próteses e na mucosa oral de pacientes saudáveis, sendo a *Candida albicans* a espécie mais relacionada com o aparecimento de doenças, dentre elas a candidíase (Valentini et al., 2013). Porém, outras espécies de *Candida*, além de bactérias como *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis* e eventualmente espécies extraorais como *Staphylococcus*, *Pseudomonas* e *Enterobacterias* também são encontradas (Pesci-Bardon et al., 2006; Thein, Samaranayake Y.; Samaranayake L., 2006; Marra, 2011).

Para reduzir o acúmulo de bactérias e fungos potencialmente nocivos, usuários de próteses são aconselhados a fazer uso de higienizadores e cremes dentais antimicrobianos rotineiramente. Porém, estudos relatam que essas técnicas não promovem a desinfecção completa da superfície e ocorre rapidamente a recolonização microbiana (Webb et al., 1998; Panzeri et al., 2009; Sivakumar et al., 2013), além disso, a limpeza da prótese pode ser de difícil execução para pacientes geriátricos que apresentam muitas vezes déficit cognitivo, destreza motora reduzida e perda de memória (Pesci-Bardon et al., 2006).

O uso de medicamentos e/ou a realização de reparos ou substituição da prótese muitas vezes são a solução para os problemas orais decorrentes do acúmulo de micro-organismos (Casemiro et al., 2008). Assim, a necessidade de desenvolver um sistema simples e eficaz para o cuidado com estes aparelhos existe e uma resina acrílica com propriedade antimicrobiana poderia possivelmente evitar a ação de micro-organismos, reduzir a retenção de biofilme e manter um ambiente limpo (Kuroki et al., 2010; Marra et al., 2012; Sivakumar et al., 2013), trazendo um avanço significativo na prevenção de patologias, melhorando a qualidade de vida dos pacientes e a higiene oral além de diminuir desconfortos e custos adicionais.

Diante deste contexto, com esforços para adicionar atividades antimicrobianas aos polímeros e demais materiais odontológicos, estudos têm utilizado diversos tipos de aditivos (Kawarara et al., 2000; Abe et al., 2004; Redding et al., 2009; Alcântara et al., 2012; Marra et al., 2012; Kumar et al., 2013; Skupien et al., 2013; Gjorgievska et al., 2013).

A atividade antimicrobiana da prata é conhecida há séculos. Dentre os íons metálicos é o material que apresenta melhores propriedades bactericidas uma vez que inclui um largo espectro de espécies microbianas e é o menos tóxico para as células animais (Kumar et al.,

2013). Algumas propriedades indesejáveis como a liberação descontínua de concentrações inadequadas de íons prata poderia limitar seu uso como agente antimicrobiano, porém, essas limitações têm sido superadas com o uso de nanopartículas de prata (AgNPs) que são altamente reativas e exibem uma grande área de superfície apresentando propriedades biológicas, físicas e químicas melhoradas em comparação com o metal não-particulado (Allaker, 2010; Kumar et al., 2013; Borzabadi-Farahani; Borzabadi; Lynch, 2013).

Estudos relatam que embora algumas bactérias tenham se tornado resistentes aos antibióticos, são menos propensas a desenvolver resistência contra nanopartículas metálicas. Na cavidade oral, as propriedades antimicrobianas das nanopartículas têm sido exploradas pela combinação com materiais odontológicos e como superfícies de revestimento (Hannig et al., 2007; Monteiro et al., 2009; Allaker, 2010; Borzabadi-Farahani; Borzabadi; Lynch, 2013). Suas propriedades antimicrobianas de amplo espectro incluem a bactéria *Streptococcus mutans*, que é o principal e mais virulento dos micro-organismos cariogênicos presentes no biofilme bucal. Este micro-organismo produz polissacarídeos que favorecem a sua aderência e a de outros micro-organismos na mucosa bucal e nas superfícies de próteses (Allaker, 2010; Cheng et al., 2012).

Assim, uma alternativa seria o desenvolvimento de resinas aditivadas com cargas de nanoestruturas, com o objetivo de reduzir a aderência microbiana e melhorar as propriedades mecânicas, melhorias estas que são de grande valia e têm estimulado diversas pesquisas.

Porém, os nanomateriais, de uma maneira geral, dentre eles as AgNPs, são termodinamicamente instáveis e apresentam uma tendência natural de se aglomerarem. Manter a homogeneidade de tamanho e forma, além de elevada dispersão, prevenindo a aglomeração, é um grande desafio. A aplicação prática das AgNPs como aditivos ficam limitadas, de certa forma, devido à dificuldade de se obter nanopartículas livres e agentes estabilizantes (Holtz et al., 2010; Holtz et al., 2012).

Assim, um grande número de sistemas tem sido desenvolvido a fim de ancorar o íon metálico e evitar a agregação das nanopartículas metálicas (Kumar et al., 2013). Neste contexto, emerge como potencial aditivo o vanadato de prata nanoestruturado decorado com AgNPs (β -AgVO₃).

Esse material, com aplicação inédita e inovadora na área odontológica, apresenta uma elevada atividade antibacteriana em um amplo espectro de bactérias gram-positivas e gram-negativas, incluindo cepas de bactérias multi-resistentes e uma elevada dispersão de nanopartículas de prata sobre nanofios de vanadatos de prata, mantendo uma alta superfície de

contato, disponível para um contato efetivo com os micro-organismos patógenos. Além disso, essa nanoestrutura apresenta a morfologia de nanofios, formando partículas secundárias semelhantes a novelos com dimensões nanométricas, podendo aderir na superfície da resina acrílica mais facilmente que somente a AgNP. Estes achados de Holtz et al. (2010) demonstram que a investigação das propriedades, sejam elas mecânicas ou antimicrobianas, de resinas odontológicas aditivadas com o β -AgVO₃ apresenta resultados promissores.

Assim, considerando a importância do desenvolvimento de produtos que estimulem a indústria nacional e proporcionem maior sucesso às reabilitações orais e qualidade de vida aos pacientes, o presente estudo teve por objetivo explorar de forma inédita o efeito da adição de diferentes porcentagens de vanadato de prata nanoestruturado nas propriedades antimicrobianas, mecânicas e morfológicas de duas resinas acrílicas (autopolimerizável e termopolimerizável), que embora sejam utilizadas rotineiramente na confecção de próteses, ainda não se enquadram no quadro final de excelência.

2 Revisão da Literatura

2.1 Tipos de Resinas Acrílicas e Composição

As resinas acrílicas são fornecidas na forma de pó, um composto de microesferas pré-polimerizadas cujos componentes são o polimetacrilato de metila (PMMA) e o peróxido de benzoíla, iniciador da reação de polimerização, e líquido que tem como componente principal o metacrilado de metila (MMA), unidade funcional da resina e ainda uma pequena quantidade de hidroquinona, inibidor da polimerização durante a armazenagem (Tornavoi et al., 2012).

A mistura do pó com o líquido deve passar por um processo que une as moléculas do monômero por meio de ligações covalentes para formar o polímero (macromolécula), este processo é denominado polimerização e é desencadeado por um ativador, que pode ser energia luminosa, energia de micro-ondas, energia térmica ou química, o que classifica o tipo de resina acrílica.

A International Organization for Standardization (ISO, 1998), classifica as resinas acrílicas em cinco tipos: tipo 1 (polímeros termopolimerizáveis), tipo 2 (polímeros autopolimerizáveis), tipo 3 (polímeros termoplásticos), tipo 4 (polímeros fotoativados) e tipo 5 (polímeros ativados por energia de micro-ondas).

A polimerização por energia térmica ou em banho d'água ocorre quando a temperatura da resina atinge 65°C, calor suficiente para decompor a molécula de peróxido de benzoíla formando radicais livres, que desencadeiam a reação de polimerização. Neste processo, uma mufla contendo a resina é mantida em temperatura constante dentro da água (Fortes, 2007).

A polimerização com agente químico ou à frio, ocorre quando uma substância química, normalmente uma amina terciária, é adicionada ao líquido e atua como um catalizador fornecendo a formação de radicais livres de peróxido de benzoíla durante a mistura do pó com o líquido. Assim, essa mistura, em temperatura ambiente desencadeia o processo de polimerização do material em um período de aproximadamente 60 minutos (Fortes, 2007).

2.2 Aderência de Micro-organismos em Resinas Acrílicas

Apesar do desenvolvimento e implantação de políticas públicas para prevenção em saúde bucal, o número de desdentados totais e parciais demonstra a necessidade e grande demanda por aparelhos protéticos odontológicos. Estes dispositivos são fundamentais para a restauração da função e da estética, no entanto, favorecem o acúmulo de micro-organismos

que levam a inúmeros problemas na cavidade oral e consequentemente da saúde geral (He et al., 2006; Compagnoni et al., 2007).

Para sobreviver na cavidade oral os micro-organismos precisam aderir às superfícies. A microbiota bucal cresce na forma de comunidades que interagem com a mucosa, superfícies dentárias ou protéticas na forma de biofilmes estruturais e funcionalmente organizados (Do; Devine; Marsh, 2013).

Donlan & Costerton (2002), definem o biofilme como uma comunidade sésil caracterizada por células que formam micro-colônias que se aderem a um substrato, a uma interface ou uma às outras de forma irreversível e estão embebidas em uma complexa matriz extracelular de substâncias poliméricas, exibindo alterações na taxa de crescimento microbiano e transcrição genética.

O biofilme é um tipo de crescimento microbiano predominante na natureza e está relacionado ao desenvolvimento de infecções, uma vez que serve de nicho aos agentes patogênicos e são mais tolerantes a agentes antimicrobianos e a defesas dos hospedeiros (Donlan; Costerton, 2002; Kuhn et al., 2002).

Os biofilmes, dentre eles o biofilme oral, são encontrados naturalmente em pacientes saudáveis e proporcionam benefício ao hospedeiro uma vez que mantém o equilíbrio saúde x doença. No entanto, a alteração dessa relação de equilíbrio pode levar a diversos problemas na cavidade oral. Sua natureza complexa e composição diversificada dificulta a identificação dos micro-organismos causadores de determinado problema (Do; Devine; Marsh, 2013).

Nikawa, Hamada & Yamamoto (1998) relataram que a composição da flora microbiana do biofilme presente na superfície de próteses é semelhante à da placa dentária, diferindo apenas por um aumento na quantidade de *Candida* spp. Vários estudos têm demonstrado uma associação entre *C. albicans* ou outras espécies de *Candida* com bactérias orais, dentre elas *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Bacteroides*, *Neisseria*, *Lactobacillus* e *Actinomyces* na superfície de próteses dentais (Morgan; Wilson, 2001; André et al., 2011; Murakami et al., 2013).

A capacidade de adesão e velocidade de formação desses micro-organismos aos aparelhos protéticos depende de fatores como a exposição à saliva e fluídos bucais, estrutura e composição da superfície do material restaurador, propriedades das células microbianas, disponibilidade de nutrientes e características do hospedeiro (Coenye et al., 2011; Murakami et al., 2013).

Ramage et al. (2004) mostraram que a arquitetura dos biofilmes presentes nas superfícies de próteses totais está associada às irregularidades e sulcos do aparelho e explica essa condição pelo fato de que os micro-organismos que ali se aderem parecem estar protegidos das ações mecânicas, existindo assim uma forte associação entre a rugosidade da superfície e a formação de biofilme.

A natureza química da superfície dos biomateriais também está relacionada com o desenvolvimento do biofilme. Estudos mostram que os micro-organismos parecem aderir-se de forma mais rápida e virulenta em superfícies hidrofóbicas como o PMMA que apresenta esta característica pela presença de unidade monoméricas em sua superfície e interação com proteínas salivares formando fortes ligações hidrofóbicas (Park; Periathamby; Loza, 2003; Yoshijima et al., 2010; Kang et al., 2013). Assim, as proteínas presentes nos fluidos bucais também interferem na adesão microbiana (Moura et al., 2006).

É importante ressaltar que essa adesão microbiana pode induzir uma resposta inflamatória crônica na mucosa oral, conhecida como estomatite protética, uma doença infecciosa comumente encontrada na mucosa oral principalmente quando se refere a usuários de próteses totais ou obturadores palatinos. *C. albicans* e *S. aureus* também têm sido associados com lesões em pacientes com queilite angular uma vez que estes micro-organismos apresentam uma elevada capacidade de adesão aos tecidos orais (Aguirre et al., 1996). Em pacientes parcialmente desdentados que fazem uso de próteses fixas ou removíveis a adesão microbiana pode levar também a problemas como doença periodontal e cárie dental, principalmente em regiões radiculares (Marra et al., 2012).

2.3 Polímeros com Atividade Antimicrobiana

Na tentativa de reduzir os níveis de biofilme, bactérias e fungos presentes na cavidade oral que podem ser potencialmente nocivos aos usuários de próteses, vários métodos têm sido propostos para conferir atividade antimicrobiana às resinas acrílicas e demais materiais odontológicos (Park; Periathamby; Loza, 2003).

De acordo com a literatura, baseado na natureza dos materiais, os polímeros com atividade antimicrobiana podem ser classificados em três categorias: biocidas poliméricos, polímeros de liberação de biocidas e revestimentos de superfície biocidas (Coenye et al., 2011).

No grupo dos biocidas poliméricos, biocidas como monômeros contendo fosfatos que exibem uma característica hidrofílica aumentada ou monômeros de ácido metacrílico são incorporados ao PMMA, ou seja, há uma alteração estrutural. Os polímeros de liberação de biocidas envolvem a incorporação de materiais como zeólitos de prata e nanopartículas de prata que não agem através da parte real do polímero e funcionam como portador para um biocida que pode ser liberado em concentrações locais. Os materiais de revestimento de superfície como sílica e dióxido de titânio modificam a natureza hidrofóbica do PMMA a uma natureza hidrofílica, mas ao contrário dos anteriores ele influencia apenas nas propriedades superficiais do PMMA (Sivakumar et al., 2013).

Biocidas Poliméricos

A modificação química da resina acrílica tem sido proposta na literatura para resistir ou diminuir a adesão microbiana (Park; Periathamby; Loza, 2003).

Park, Periathamby & Loza (2003) investigaram a capacidade antimicrobiana de uma resina acrílica modificada com ácido metacrílico e observaram que à medida que a proporção do ácido aumentava, a área superficial de aderência de *C. albicans* reduzia. A incorporação de 10% do ácido promoveu redução significativa na adesão da levedura. Porém, um estudo posterior mostrou que resinas com maior quantidade do ácido metacrílico apresentaram valores de resistência à flexão inferiores quando comparados ao grupo controle (Park; Chao; Raj, 2009).

Devido às suas características antibacterianas e polimerizáveis, o brometo de metacrililoiloxidodecilmiridínio (MDPB) tem sido associado com vários biomateriais resinosos. Pesci-Bardon et al. (2006) combinaram uma resina acrílica polimerizada por calor com o MDPB para determinar a porcentagem capaz de promover propriedades anti-sépticas e encontraram efeitos significativos mostrando que a resina apresentou efeito bactericida frente a *C. albicans* (50%), *P. aeruginosa* (10%), *S. aureus* e *E. coli* (2%).

Dhir et al. (2007) estudaram as propriedades físicas de uma resina acrílica contendo diferentes concentrações de um monômero experimental composto por um radical polar (fosfato), substituídos pelo monômero da resina acrílica nas proporções de 0, 10 e 20%. Sua adição teve potencial para diminuir a aderência de *Candida*. Porém, observou-se diferença significativa entre os grupos quanto à resistência flexural, sendo esta mais pronunciada no grupo ao qual foram adicionados 20%.

Raj & Dentino (2011) avaliaram a eficácia antimicrobiana de um polímero contendo 6 diferentes concentrações de grupos fosfato (0% - controle, 5%, 15%, 20% e 25%) e observaram que a presença de 15% de teor de fosfato no polímero utilizado para base de prótese foi suficiente para reduzir de forma significativa a adesão de *C. albicans* e concluiu que esse método tem potencial para reduzir a colonização da levedura e evitar a estomatite protética. Esse achado pode ser complementado pelos resultados anteriormente observados por Dhir et al. (2007), onde não foram observadas diferenças significantes nas propriedades de resistência ao impacto, à flexão, à fratura e sorção de água quando comparou-se uma resina com 10% de fosfato e o grupo controle.

Regis et al. (2012) avaliaram a atividade antimicrobiana do composto copolimerizável (MUPB). Em baixa concentração observou-se atividade antimicrobiana contra *C. albicans*. Porém, mesmo em baixas concentrações o material apresentou citotoxicidade, afirmando a necessidade de mais estudos a respeito do uso do composto.

O metacrilato de 2-terc-butilaminoetilo (TBEMA) é um monômero de acrilato monofuncional que contém grupos amino e atua como um biocida eficaz. Marra et al. (2012) avaliaram a atividade antimicrobiana de uma resina acrílica combinada com um polímero antimicrobiano poli 2-terc-butilaminoetilo (PTBEMA) nas concentrações de 0% -controle, 10 e 25% por meio da contagem de unidades formadoras de colônia e observou que embora não tenha apresentado atividade frente a *C. albicans*, a 25% inibiu completamente a formação de biofilme de *S. aureus* e *S. mutans*. Porém em estudo posterior de Rodriguez et al. (2013) foi possível observar que concentrações acima de 1,75% promovem redução na resistência à flexão do material.

Revestimentos de Superfície Biocida

A limpeza mecânica do aparelho protético consiste em um bom método para remoção do biofilme. No entanto, a idade avançada do paciente e algumas doenças fazem com que os mesmos apresentem dificuldades em manter seus aparelhos limpos.

O passo inicial no desenvolvimento do biofilme é a aderência de bactérias e/ou fungos à superfície, iniciada pela interação entre os compostos da parede celular e a superfície. Assim, com o intuito de melhorar a higiene da prótese, estudos têm modificado a superfície hidrofóbica das resinas por meio de materiais de revestimento (Arai et al., 2009), de modo a reduzir a interação do micro-organismo com o substrato (Coenye et al., 2011).

O dióxido de titânio (TiO₂) tem sido utilizado como material de revestimento em inúmeros produtos devido a suas propriedades altamente hidrofílicas, inclusive em cateteres de uso médico. Arai et al. (2009) avaliaram o efeito de um revestimento de TiO₂ em resina acrílica utilizada para base de prótese na inibição da adesão microbiana e demonstraram que o revestimento resultou em um efeito inibitório sobre a adesão de *S. sanguinis* e alterou a forma da *C. albicans*.

Park et al. (2008) investigaram dois métodos para reduzir a adesão de *C. albicans* na superfície de resina acrílica através da modificação das características da superfície pela incorporação de radicais polares e pela aplicação de um polímero auto-aderente. Três grupos foram testados: controle (PMMA puro), PMMA modificado com 16% de ácido metacrílico, PMMA tratado com um polímero auto-aderente. Observou-se que após 2 dias a resina modificada com ácido metacrílico apresentou menor nível de adesão de *Candida* quando comparada aos demais grupos. Entretanto, os grupos com resina modificada e com superfície tratada com polímero auto-aderente não apresentaram diferença após 4, 6 e 12 dias de incubação. Este estudo mostra que modificações nas características de superfície de polímeros é um método eficaz na redução da adesão de *C. albicans* à superfície de PMMA.

Polímeros de Liberação de Biocidas

Várias abordagens têm sido realizadas por meio da incorporação de materiais antimicrobianos que não atuam na parte real dos polímeros.

Amin et al. (2009) incorporaram drogas antifúngicas (fluconazol, clorexidina e a combinação de ambas) em uma resina acrílica autopolimerizável e avaliaram a liberação das mesmas e o efeito no crescimento de *C. albicans*. Os resultados mostraram que as duas drogas isoladas ou a combinação, podem ser incorporadas ao PMMA. Foi evidenciada liberação das drogas para água destilada ao longo de 28 dias. A inibição do crescimento foi encontrada em todos os grupos, com valores mais expressivos para o grupo onde as duas drogas foram combinadas. Conclui-se que os resultados deste estudo têm uma relevância clínica uma vez que pode contribuir significativamente no tratamento de infecções fúngicas da cavidade oral.

Redding et al. (2009) avaliaram a capacidade de um polímero contendo antifúngicos (diacetato de clorexidina a 1 %, nistatina a 1% e anfotericina B a 0,1%) em inibir a formação de biofilme de *Candida* sobre a superfície de resina acrílica. Uma redução significativa de 70 a 80% foi encontrada para o grupo contendo nistatina, de 50 a 60% para o grupo contendo

anfotericina B e até 98% para o grupo contendo clorexidina. Concluíram que a aplicação de um polímero contendo antifúngicos inibe efetivamente a formação de biofilme de *C. albicans* na superfície de resina acrílica e deve ser avaliada como uma possível terapia preventiva para estomatite protética.

Monteiro et al. (2009), por meio de uma revisão da literatura, avaliaram diferentes formas de incorporação de prata (zeólito de prata, nanopartículas de prata e íons de prata) como agente antimicrobiano frente a vários micro-organismos e biofilme. De acordo com os autores, as características de liberação dos íons de prata dependem da natureza da prata e da matriz polimérica utilizada. E que tanto a prata elementar, zeólitos de prata e nanopartículas de prata podem ser utilizados como biomateriais antimicrobianos para uma variedade de aplicações.

Bueno et al. (2013) avaliaram a ação de agentes antimicrobianos (nistatina, miconazol, cetoconazol, intraconazol e clorexidina diacetato) incorporados em materiais reembasadores na atividade antibiofilme de *C. albicans*. Os agentes antimicrobianos incorporados inibiram o crescimento de fungos durante 14 dias, sendo as concentrações inibitórias mínimas mais baixas para nistatina e clorexidina.

No presente estudo, será dado maior enfoque à utilização de nanopartículas (NPs) e materiais antimicrobianos à base de prata.

2.4 Nanopartículas e Materiais à Base de Prata como Agentes Antimicrobianos

Atualmente a nanotecnologia oferece diversas condições para o desenvolvimento de novos materiais antimicrobianos (Wady et al., 2012). Isso ocorre devido a características inerentes dos materiais nanométricos que por possuírem um tamanho reduzido (1 – 100 nm) apresentam uma maior proporção superfície-volume (por unidade de massa) quando comparados com materiais não nanométricos, isso faz com que haja uma interação mais efetiva com membranas microbianas (Borzabadi-Farahani; Borzabadi; Lynch, 2013).

A prata apresenta uma longa história de aplicação e é conhecida por ter propriedades antimicrobianas superiores a outros metais e não metais. Essa propriedade aumenta quando é preparada na forma de nanopartículas. Porém, apesar dos íons e outros compostos derivados da prata serem altamente tóxicos para os micro-organismos, possuem baixa toxicidade aos seres humanos, quando em doses adequadas (Khurana et al., 2013; Cheng et al., 2013). Outra

vantagem é a estabilidade satisfatória e a baixa possibilidade de desenvolver linhagens resistentes aos antibióticos (Cheng et al., 2013).

Tem sido reconhecido que os íons de prata são os principais responsáveis pela atividade antimicrobiana (Muñoz-Bonilla; Fernández-García, 2012; Kumar et al., 2013). A carga positiva desses íons permite uma atração eletrostática com a carga negativa da membrana celular das bactérias (Monteiro et al., 2009) garantindo o potencial antimicrobiano, uma vez que, ao aderirem à superfície, comprometem suas funções básicas como a permeabilidade e a respiração (Morones et al., 2005), mudando a estrutura da membrana da bactéria, por meio da interação das AgNPs com compostos sulfurados e fosforados, podendo causar a morte celular (Yamanaka; Hara; Kudo, 2005).

Em relação aos mecanismos moleculares, a ação inibitória dos íons de prata nos micro-organismos se dá por meio da perda da capacidade do DNA em replicar-se (Feng et al., 2000), da inativação de algumas proteínas celulares e enzimas necessárias na produção de ATP (Yamanaka; Hara; Kudo, 2005) contribuindo na geração de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*) e subsequente dano por efeito oxidativo (Monteiro et al., 2009).

Devido a sua grande área superficial específica, as AgNPs possuem propriedades antimicrobianas maiores que a prata metálica (“bulk”) ou mesmo os sais de prata (Rai; Yadav; Gade, 2009), além de liberarem íons de prata de forma contínua e na concentração adequada para manter um efeito antimicrobiano (Yamanaka; Hara; Kudo, 2005). Ademais, Morones et al. (2005) sugerem que a AgNPs na faixa de 1 a 10 nm têm as melhores propriedades bactericidas.

Recentemente as AgNPs ganharam muita popularidade em diversas aplicações tais como, gel antimicrobiano, cosméticos, curativo para queimaduras e feridas, tecido de algodão e cateteres (Wady et al., 2012). Na odontologia, o uso se dá por meio da incorporação do nanomaterial em resinas acrílicas e materiais reembasadores para base de prótese, materiais obturadores de canais radiculares, dentre outros (Samiei et al., 2013).

Porém, embora as nanopartículas sejam materiais importantes para aplicações técnicas diversificadas e apresentem diversas vantagens, quando utilizadas sozinhas, apresentam alguns problemas comuns, como por exemplo, a aglomeração entre nanopartículas (Shameli et al., 2011). Assim, para ampliar a utilização das nanopartículas de prata e melhorar alguns problemas inerentes a elas, foi desenvolvido o vanadato de prata nanoestruturado decorado

com AgNPs (β -AgVO₃). Esse material apresenta propriedades bactericidas semelhantes às AgNPs, pois liberam íons de prata, sendo a concentração mínima de inibição de crescimento para uma cepa de *Staphylococcus aureus* aproximadamente trinta vezes menor do que o antibiótico oxacilina (Holtz et al., 2010). O vanádio também pode interagir com grupamentos tiol das membranas celulares das bactérias formando complexos estáveis, podendo causar interferência em algumas reações bioquímicas da célula bacteriana, contribuindo de forma sinérgica para a atividade antibacteriana das nanopartículas de prata.

Figura 1. Vanadato de prata nanoestruturado decorado com AgNPs

Fonte: Holtz et al. (2010)

Uma vantagem deste composto sobre as AgNPs, é que de acordo com a literatura, ele evita a aglomeração das nanopartículas de prata, mantendo alta superfície de contato com os micro-organismos, aumentando assim, suas propriedades antimicrobianas (Holtz et al., 2010).

O vanadato de prata nanoestruturado decorado com AgNPs tem duas funções: atuar como um agente de suporte e liberar as AgNPs. Além disso, ele reduz a perda das nanopartículas de prata por lixiviamento e possui o formato de um novelo de fios com dimensões nanométricas (Holtz et al., 2010), podendo aderir à superfície da resina acrílica mais facilmente que somente a AgNP.

A literatura é escassa no assunto do presente trabalho uma vez que a utilização de vanadato de prata nanoestruturado em odontologia é inédita, porém alguns estudos que utilizaram materiais à base de prata na área médica e odontológica encontram-se abaixo.

Enquanto alguns autores sugerem que a eficiência antimicrobiana de polímeros incorporados com AgNPs está relacionada com a liberação de íons prata, outros relatam que o efeito inibitório é provavelmente devido ao contato direto entre o micro-organismos e o material (Wady et al., 2012).

Em meados da década de 90, alguns estudos constataram a eficácia das propriedades antimicrobianas de materiais dentários incorporados com íons de prata (Schierholtz et al., 1998; Yamamoto et al., 1996).

Posteriormente, a eficácia de alguns materiais modificados foi avaliada, como o cimento ósseo de polimetilmetacrilato carregado com AgNP, que apresentou alta atividade antimicrobiana para as bactérias *S. epidermidis* e *S. aureus* resistente à meticilina enquanto obteve uma baixa citotoxicidade para osteoblastos humanos (Alt et al., 2004).

Na área médica, já são utilizados materiais revestidos com prata a fim de obter propriedades antimicrobianas. Um cateter urinário revestido por uma liga de prata reduziu significativamente a taxa de infecção do trato urinário e não foram encontrados patógenos resistentes à prata nos pacientes durante o período do estudo (Rupp et al., 2004).

O trabalho de Ohashi, Saku & Yamamoto (2004) indica que os íons de prata têm um efeito antimicrobiano sobre duas bactérias presentes na saliva humana (*S. mutans* e *A. viscosus*) e ao mesmo tempo, baixa citotoxicidade para as células humanas HeLa, viabilizando a incorporação da prata em materiais dentários.

Casemiro et al. (2008), incorporaram zeólito de prata em diferentes concentrações (0%-controle, 2,5%, 5%, 7,5% e 10%), em resinas acrílicas. A atividade antimicrobiana foi avaliada por meio do método de difusão em ágar e as propriedades de resistência a flexão e impacto também foram consideradas. A adição de 2,5% foi suficiente para promover atividade antimicrobiana contra *C. albicans* e *S. mutans*, porém, porcentagens maiores ou iguais a 2,5% resultaram em uma diminuição das propriedades mecânicas.

Chladek et al. (2011) avaliaram a eficácia da incorporação de AgNP em materiais reembasadores resilientes a base de silicone contra *Candida albicans*. A incorporação de 10 ppm de AgNP no material, apresentou uma eficácia antifúngica de 16,3%, enquanto que a 40, 80 e 120 ppm, apresentaram 31,5%, 36,6% e 47,8%, respectivamente. Portanto, a incorporação de AgNP em materiais à base de silicone podem ser capazes de prevenir o crescimento deste fungo.

De acordo com Agnelli (2011), uma resina composta incorporada com 0,3% em massa de AgNPs, apresentou significativa redução da adesão de *Streptococcus mutans*, em comparação com o controle e com 0,1%, e melhores propriedades mecânicas quando comparada ao grupo incorporado com 0,6%.

A metodologia empregada por Monteiro et al. (2012), permite que o mesmo afirme que as resinas acrílicas incorporadas com AgNPs não liberam íons de prata quando armazenadas em água deionizada a 37°C até 120 dias, o que é desejável, considerando o tempo de uso deste material aproximadamente 5 anos.

Pode-se observar que, embora alguns compostos apresentem bons resultados quando incorporados a outros materiais, não há na literatura uma evidência confiável para proporcionar verdadeira recomendação sobre a adição. É necessária uma avaliação sobre a real efetividade do material, incluindo a concentração terapêutica ótima que não deteriore as propriedades mecânicas do substrato, não produza efeitos tóxicos sobre a mucosa oral e que não seja rapidamente liberado, perdendo sua eficácia em pouco tempo (Pesci-Bardon et al., 2006; Paleari et al., 2011; Skupien et al., 2013).

2.5 Técnicas Empregadas na Análise de Biofilmes

Um dos principais requisitos em microbiologia é quantificar micro-organismos de forma rápida e confiável (Ammann et al., 2013). Ao longo das últimas décadas, uma ampla variedade de modelos tem sido descrita para o estudo *in vitro* da formação e desenvolvimento de biofilme, no entanto cada método apresenta suas limitações (Peeters; Nelis; Coenye, 2008; Silva et al., 2008).

A seguir serão descritas as técnicas empregadas no presente estudo considerando suas vantagens e desvantagens.

Microscopia Confocal de Varredura à Laser (CLSM)

A microscopia de fluorescência consiste no método mais sensível para caracterizar a viabilidade microbiana. Esta técnica envolve o uso de marcadores fluorescentes, denominados fluorocromos, que possibilitam a avaliação de aspectos funcionais e estruturais das células microbianas. O fluorofoto é responsável pela produção de fluorescência (Silva, 2009).

Entre as técnicas de microscopia de fluorescência, a técnica da microscopia confocal à laser, desenvolvida nos anos 80, associada a aplicado de fluorocromos específicos fornece aos pesquisadores a capacidade para examinar biofilmes sem as limitações encontradas quando se realiza a microscopia eletrônica de varredura (MEV), uma vez que dispensa os procedimentos de desidratação e embebição da amostra (Silva, 2009; Culler, 2010).

Assim, a arquitetura e organização interna do biofilme são mantidas, além de características como espessura e viabilidade celular. Essa técnica apresenta ainda vantagens como a capacidade de captar imagens em diferentes profundidades, facilitando a visualização de espécimes irregulares, densos e espessos (Silva, 2009), a possibilidade de obter

reconstruções tridimensionais (3D) e consequentemente observar a localização exata da distribuição espacial do micro-organismo com acurácia (Shen et al., 2009) e a possibilidade de identificar células vivas e mortas (Zapata et al., 2008).

Segundo Shen et al. (2009) as mensurações quantitativas da viabilidade do biofilme através desse método provêm um poderoso instrumento para análises das dinâmicas de inativação por agentes antimicrobianos. Essa técnica pode ser usada como um complemento para os estabelecimentos microbiológicos, histológicos e padrão de microscopia eletrônica.

É fundamental possuir parâmetros de interpretação da técnica, já que a mesma permite seccionamento ótico que gera inúmeras fatias da área de interesse e a possibilidade da reconstrução 3D. O avaliador deve estar calibrado assim como o foco para padronização das imagens obtidas (Flach, 2010).

Em relação aos fluorocromos empregados na análise de viabilidade celular, o kit Live Dead BacLight (Molecular Probes) tem sido muito utilizado não só para análise da viabilidade bacteriana como para *Candida*. Esse kit é composto de dois fluorocromos de afinidade pelos ácidos nucleicos, o syto-9 e o iodeto de propídeo.

Através da coloração atribuída por eles, é possível determinar a viabilidade microbiana tendo como parâmetro a integridade da membrana citoplasmática que é imprescindível para a manutenção da viabilidade celular. Quando usado sozinho, o fluorocromo syto-9 penetra tanto em células vivas como em células mortas. Em contraste, o iodeto de propídeo penetra somente em micro-organismos mortos, com membrana comprometida. Quando usados simultaneamente, o iodeto de propídeo reduz o syto-9 no interior das células mortas. Assim, micro-organismos vivos, com membrana intacta demonstram fluorescência verde, enquanto micro-organismos mortos com membrana comprometida apresentam fluorescência vermelha (Culler, 2010).

Ensaio de XTT

Em 1993, Schaule, Flemming & Ridgway propuseram o uso de um sal de tetrazólio, o 5-ciano-2,3-ditolil-tetrazolium hydrochloride (CTC) para a quantificação microscópica de um fluorescente insolúvel produzido durante evento da respiração microbiana. Porém, esta técnica é considerada muito trabalhosa. Assim, outro derivado de tetrazólio o 2,3 bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenly) -5-[(phenylamino) carbonyl]-2H-tetrazolium tem sido mais

utilizado uma vez que promove a formação do formazan insolúvel, que permite a quantificação colorimétrica de maneira mais simples.

Inicialmente o XTT foi utilizado na análise do crescimento de células humanas, dentre elas células tumorais, bem como de células animais e posteriormente foi incluído nos estudos com micro-organismos (Gobor et al., 2011). O método baseia-se na atividade metabólica de células viáveis (Culler, 2010) por meio da redução intracelular do sal, formando um composto denominado formazan que pode ser quantificado pela alteração de cor (laranja), permitindo uma boa avaliação da concentração à qual o agente antimicrobiano deixou de ser efetivo e pode ser visualizada por inspeção visual ou medida por espectrofotometria, um método de análises óptico comumente usado nas investigações biológicas e físico-químicas que utiliza a interação da luz com a matéria (Cardoso, 2004). A absorbância do sobrenadante das células é proporcional ao número de células microbianas metabolicamente ativas.

Apesar do alto custo do kit (Culler, 2010), esse é um método simples (Piva et al., 2011) que foi utilizado por muito tempo para quantificar células viáveis em culturas planctônicas, bactérias e leveduras, porém, apesar de sua popularidade alguns autores têm questionado sua precisão e relatado alguns problemas inerentes à técnica (Culler, 2010; Silva et al., 2008).

O biofilme se desenvolve em estruturas espaciais complexas que resulta numa distribuição desigual de nutrientes através das suas múltiplas camadas, isso faz com que a população celular seja heterogênea. Assim, as camadas mais superiores ricas em nutrientes exibem uma atividade metabólica relativamente mais elevada quando comparada às camadas basais. Portanto, o ensaio de redução do XTT em biofilmes maduros pode subestimar a atividade celular (Silva et al., 2008).

Kuhn et al. (2003) também relata este problema de diferença no metabolismo do substrato e diz que a relação entre o número de células e de absorção não tem necessariamente uma relação linear pelo diferente gradiente de metabolismo entre os biofilmes.

Assim, algumas tentativas têm sido propostas para melhorar o ensaio, dentre elas a complementação com vários ingredientes, tais como a glicose para compensar a desigualdade metabólica nas diferentes camadas do biofilme e aumentar a precisão do estudo (Silva et al., 2008). Silva et al. (2008) realizou este procedimento, mas embora esta abordagem tenha sido promissora, micro-organismos que crescem em condições de anóxia ou células aeróbicas presentes nas camadas basais, protegidos contra oxigênio atmosférico, que não promoveriam a redução do XTT, podem ter seu metabolismo impulsionado a via fermentativa.

Unidades Formadoras de Colônias (UFC)

O procedimento mais comumente usado para mensurar a formação de biofilme é a contagem de viabilidade em placas de Petri, ou seja, a contagem de UFC (Culler, 2010).

Algumas vantagens e desvantagens a respeito dessa técnica têm sido descritas. Como vantagens cita-se que células inviáveis, fragmentos de células mortas e material difundido no meio de cultura não interferem na obtenção dos resultados. É possível estabelecer comparações do padrão de crescimento sob diferentes condições ambientais e populações microbianas e permite uma estimativa do número de células viáveis por mL da população.

Como desvantagem pode-se citar que essa técnica quantifica apenas organismos viáveis e que se replique (Ammann et al., 2013), ou seja, aqueles capazes de formarem colônias porém, muitos indivíduos viáveis podem não se replicar prejudicando o cálculo. Uma vez que apenas colônias visíveis são contadas, os micro-organismos devem ser capazes de crescer até se tornarem visíveis, no entanto, não apenas as células individuais, mas também grandes agregados resultam em uma colônia visível (Ammann et al., 2013; Gobor et al., 2011). Outros fatores que prejudicam a análise são: (1) as diluições podem não ser homogeneizadas corretamente; (2) um número muito pequeno ou muito grande de colônias pode ser usando na contagem; (3) o operador pode não fazer o espalhamento rapidamente e de forma adequada; (4) a cada diluição um erro experimental é introduzido pela instrumentação e pelo operador. Além disso, o método necessita de grande quantidade de material e detecta apenas um número reduzido de células, que prejudica a estimativa do estudo (Culler, 2010).

2.6 Técnicas Empregadas para Avaliação das Propriedades Mecânicas

A incorporação de materiais antimicrobianos em resina acrílica pode ser uma alternativa para impedir ou reduzir o crescimento de micro-organismos na superfície de próteses odontológicas. Portanto, surge a necessidade de investigar qual o efeito desta alteração sobre as propriedades mecânicas das resinas, uma vez que as mesmas não devem ser sacrificadas e podem até ser melhoradas se os mesmos funcionarem como partículas de reforço (Straioto et al., 2010). Para isso, vários métodos estão disponíveis com o objetivo de avaliar essas propriedades *in vitro*, dentre elas a dureza superficial, resistência à compressão, rugosidade superficial, resistência à flexão e ao impacto (Barbosa et al., 2007).

Resistência à Flexão

Na odontologia existem diversos tipos de tensões desenvolvidas que variam com a natureza da força aplicada e a forma do objeto e podem influenciar na durabilidade de um tratamento reabilitador. Essas forças podem ser simples como a de compressão ou complexas como a de flexão.

Assim, a resistência à flexão é uma propriedade de extrema importância para a resina acrílica, uma vez que a maior causa de fraturas de próteses dentárias dentro na cavidade oral está relacionada a forças mastigatórias repetidas que envolvem este tipo de força (Ayaz; Durkan, 2013).

O ensaio de resistência à flexão dos materiais dentários simula *in vitro* a carga que afeta a maxila e a mandíbula quando em função. Assim, as resinas devem ser capazes de sustentar maior flexão para serem menos propensas às falhas clínicas. Essa técnica geralmente é realizada por meio de máquinas universais de ensaio, onde um espécime retangular é posicionado horizontalmente e sustentado por dois apoios nas extremidades e a carga é aplicada no centro. Essa situação cria tensões de natureza complexa, com o início da fratura na zona de aplicação da carga, formação de microtrincas e o seu término na área de tração (Diaz-Arnold et al., 2008; Machado et al., 2012).

Resistência à Compressão

Define-se resistência à compressão como a máxima tensão de compressão suportada por um material durante um ensaio de compressão.

A ASTM D 695 é o principal método para a padronização da execução dos ensaios de compressão e posterior interpretação dos resultados que são obtidos através das curvas tensão de Compressão x Deformação.

Figura 2.Esquema para fixação e realização de um ensaio de compressão

A resistência à compressão é uma importante propriedade a se considerar na escolha de um material restaurador uma vez que forças compressivas são transmitidas aos tecidos de suporte na cavidade oral (Gouvêa et al., 2008; Daltoé et al., 2013) e na presença de hábitos parafuncionais como o bruxismo este fator se multiplica, sendo frequente a ocorrência de fraturas dos elementos dentais, restaurações e próteses dentárias (Onodera et al., 2006). Testes laboratoriais que avaliam esta propriedade apesar de não reproduzirem com fidelidade os mecanismos de falhas encontrados em condições clínicas (Brito; Couto; Gouvêa, 2007) são importantes para o conhecimento inicial da resistência à compressão dos polímeros, fornecendo informações e explicações significativas para os profissionais durante a comparação dos materiais odontológicos, auxiliando o planejamento e a execução de testes mais complexos.

Resistência ao Impacto

Um problema frequente que ocorre com próteses removíveis é a fratura, reconhece-se, portanto que o PMMA não atende às exigências mecânicas para próteses que são submetidas a grande estresse em função mastigatória (Murakami et al., 2013). As causas subjacentes à fratura podem ser de difícil determinação devido ao grande número de variáveis, mas geralmente está associada à queda acidental, forças mastigatórias repetidas, áreas de concentração de tensões que podem iniciar ou propagar rachaduras existentes e porosidade do material (Faot et al., 2006; Machado et al., 2012).

A ocorrência de fraturas em próteses resulta em custos adicionais bem como desconforto aos pacientes. Por esta razão, a resistência ao impacto é uma propriedade desejável aos polímeros, uma vez que mede a energia necessária para iniciar e propagar uma fenda através do material assim, pode refletir a força de contato necessária para causar fratura em uma prótese em situações como a queda acidental (Machado et al., 2012; Wady et al., 2011).

Para simular fraturas experimentais, os ensaios de resistência ao impacto (Izod ou Charpy) são utilizados, ambos são de simples execução e baixo custo. Com o ensaio Charpy, o espécime é posicionado em um plano horizontal com dois apoios e é atingido no meio por um pêndulo. O procedimento para o teste Izod é bastante semelhante, porém a amostra é sustentada na posição vertical e o pêndulo atinge a extremidade superior livre. Embora o teste

de impacto seja influenciado pela configuração de carga, existe uma boa relação entre os dois métodos (Faot et al., 2006).

Dureza Superficial

Entre os diversos testes mecânicos conhecidos para avaliar as propriedades das resinas acrílicas, o ensaio de microdureza tem sido amplamente estudado e reconhecido como um método altamente confiável e capaz de sugerir a pré-seleção dos materiais.

A dureza é definida como a resistência de um material à penetração em sua superfície e no caso de polímeros odontológicos pode estar associada a forças provenientes da oclusão e da limpeza mecânica realizada diariamente, bem como ao contato dos fluidos orais que podem alterar as propriedades de superfície da prótese (Straioto et al., 2010; Ayaz; Durkan, 2013; Goiato et al., 2013).

Os ensaios de dureza podem ser classificados em dureza por choque, por risco e por penetração, sendo os últimos os mais utilizados no ramo da metalurgia e da mecânica e citados nas especificações técnicas. Nestes ensaios, um penetrador ou indentor é forçado contra a superfície do material testado em condições controladas de carga e taxa de aplicação. A área da marca superficial formada ou a sua profundidade são medidas e correlacionadas com um valor numérico que representa a dureza do material. Esta correlação é baseada na tensão de que o penetrador necessita para vencer a resistência da superfície do material e depende diretamente das forças de ligações entre os átomos, íons ou moléculas, assim como da resistência mecânica (Ayaz; Durkan; Bagis, 2013; Reis et al, 2013).

Quanto mais macio o material, maior e mais profunda é a impressão e menor é o valor de dureza. A dureza é definida como a razão entre a carga aplicada e a área superficial da impressão provocada na superfície do material.

A carga e a forma do penetrador variam para cada tipo de ensaio. Cada teste apresenta uma equação para o cálculo da dureza que leva em consideração a carga aplicada e parâmetros da figura impressa pelo penetrador na superfície da amostra. Os testes de dureza mais utilizados são os de dureza Brinell (HB), Rockwell (HR), Knoop (HK) e o Vickers (HV) sendo os dois últimos conhecidos como testes de microdureza por causar uma impressão microscópica no material testado. Estes ensaios são ideais para medir a dureza de materiais frágeis, de peças pequenas ou extremamente finas, entre eles, as resinas acrílicas (Ayaz; Durkan, 2013; Rueggeberg; Craig, 1988; Asmussem, 1982).

A dureza Vickers, introduzida em 1925, usa como penetrador uma pirâmide de diamante de base quadrada. Durante os ensaios de microdureza a carga pode variar de 0,01 a 1kgf e é mantida constante por um tempo específico entre 10 a 30 segundos. O penetrador de Vickers é pressionado na amostra deixando uma pirâmide de base quadrada em sua superfície.

Figura 3. Penetrador Vickers

O teste de microdureza Knoop é semelhante à microdureza Vickers, permitindo aplicação de cargas entre 0,01 e 1kgf, diferenciando basicamente pela forma piramidal alongada do penetrador.

Figura 4. Penetrador Knoop

Os ensaios de microdureza requerem uma preparação cuidadosa dos corpos de prova (lixamento e polimento) para que a impressão seja nítida. Portanto, para se obter um bom desempenho de próteses confeccionadas em resina acrílica este material deve apresentar dureza satisfatória.

Rugosidade Superficial

A rugosidade de superfície é uma das principais propriedades utilizadas para avaliação do desempenho de qualquer material odontológico utilizado na confecção de próteses e é determinada pela presença de poros e outras irregularidades.

A presença de rugosidade na superfície de materiais restauradores e protéticos interfere significante nas propriedades do material e pode reduzir sua durabilidade. Esta propriedade é frequentemente discutida na literatura uma vez que a capacidade de aderência microbiana é influenciada por diferenças nas superfícies da prótese (Yildirim-Bicer et al., 2014).

Kuhar & Funduk (2005) demonstraram que superfícies rugosas de resinas acrílicas são significativamente mais susceptíveis ao acúmulo de micro-organismos e formação de biofilme do que superfícies lisas.

Al-Dwairi, Al Quran & Al-Omari (2012) relataram que a rugosidade superficial fornece nichos e microporos aos quais os micro-organismos ficam protegidos das forças atuantes na cavidade oral e de medidas de higiene bucal aderindo-se de forma irreversível a uma superfície.

Para esta análise existem equipamentos específicos denominados Rugosímetros que funcionam através de uma agulha capaz de percorrer a superfície da amostra e registrar o perfil da mesma através do marcador ou no formato de um gráfico.

2.7 Análises Morfológica e Química dos Materiais

Além de estudar os efeitos da incorporação de agentes antimicrobianos sobre as propriedades microbiológicas, físicas e mecânicas das resinas, informações sobre a dispersão desses agentes no material são necessárias.

O carregamento da droga, tamanho de partícula e dispersão são fatores importantes que afetam a liberação do agente. Para isso uma análise do padrão da incorporação do agente antimicrobiano na resina através da microscopia eletrônica de varredura (MEV) é importante. Assim como a espectroscopia por energia dispersiva de raios x (EDS) a fim de identificar o antimicrobiano e os componentes da resina (Urban et al., 2009; Reis et al., 2013).

As microestruturas determinam muitas das propriedades de interesse para os materiais e sua formação depende fundamentalmente da composição química e do processamento

(Chang et al., 2014). Resoluções altas e imagens com contrastes adequados são necessários para ilustrar as melhores características estruturais. Neste contexto, a microscopia eletrônica de varredura tem um papel relevante pelas possibilidades de analisar microestruturas e identificar fases e segregações químicas, que frequentemente são associados a interfaces ou defeitos da estrutura.

A microscopia eletrônica associada à microanálise possibilita, por exemplo, a visualização de detalhes da estrutura, mesmo em dimensões nanométricas e a análise química localizada na região de interesse.

O microscópio eletrônico de varredura (MEV) é geralmente utilizado para observações de amostras espessas, ou seja, basicamente não transparentes a elétrons. A razão principal de sua utilização está associada à alta resolução que pode ser atingida (Júnior; Filho, 2005).

A energia dispersiva de espectroscopia de raios x (EDS) tem sido muito utilizada como uma técnica de micro análise química em conjunto com MEV a fim de fornecer uma análise elementar semi quantitativa e qualitativa de raios-x e os detalhes da composição da amostra (Chang et al., 2014).

3 Proposição

O objetivo geral deste trabalho foi incorporar o vanadato de prata nanoestruturado (β -AgVO₃) nas resinas acrílicas mais utilizadas para confecção de próteses odontológicas, sendo elas as resinas autopolimerizável e termopolimerizável, como potencial agente antimicrobiano e estrutura de reforço.

Como objetivos específicos foram estudados:

1. Características físico-químicas e morfológicas do nanomaterial.
2. Concentração inibitória mínima do nanomaterial contra micro-organismos específicos.
3. Efetividade antimicrobiana das resinas acrílicas com diferentes porcentagens do nanomaterial contra micro-organismos específicos.
 - 3.1 Ensaio de redução de sais de tetrazólio-XTT.
 - 3.2 Contagem de unidades formadoras de colônias.
 - 3.3 Microscopia confocal à laser.
4. Propriedades mecânicas e morfológicas das resinas acrílicas incorporadas com o nanomaterial.
 - 4.1 Dureza superficial.
 - 4.2 Rugosidade superficial.
 - 4.3 Resistência à flexão.
 - 4.4 Resistência à compressão.
 - 4.5 Resistência ao impacto.
 - 4.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).
 - 4.7 Micro análise de raios-X (EDS).

4 Material e Método

4.1 Material

4.1.1 Vanadato de Prata Nanoestruturado decorado com AgNPs

O vanadato de prata nanoestruturado decorado com AgNPs foi produzido e caracterizado no Laboratório de Química do Estado Sólido (LQES-IQ-UNICAMP).

4.1.2 Resinas Acrílicas

Para o estudo, foram selecionadas duas resinas acrílicas odontológicas comerciais, especificadas a seguir na Tabela 1.

Tabela 1. Marcas comerciais e composição das resinas acrílicas utilizadas

Resina Acrílica (Fabricante)	Classificação	Pó	Líquido
Dencôr Lay (Clássico®, Art. Clássico, São Paulo, SP)	Autopolimerizável	Polimetilmetacrilato Peróxido de Benzoíla Pigmentos Biocompatíveis	Monômero de Metilmetacrilato Inibidor de polimerização DMT
Clássico (Clássico®, Art. Clássico, São Paulo, SP)	Termopolimerizável	Copolímero Metil Etil Metacrilato DBP Pigmentos	Monômero de Metilmetacrilato Topanol

4.2 Método

4.2.1 Síntese do Vanadato de Prata Nanoestruturado

O Vanadato de prata nanoestruturado foi sintetizado através de uma reação de precipitação entre o nitrato de prata (AgNO_3 , Merck 99,8%) e o vanadato de amônio (NH_4VO_3 , Merck 99%). Inicialmente, 0,9736 g de NH_4VO_3 e 1,3569 g de AgNO_3 foram solubilizadas em 200 mL de água destilada, respectivamente. As soluções foram agitadas separadamente em superfície aquecida à 65°C, durante 10 minutos. A seguir, a solução de nitrato de prata foi adicionada gota a gota com o uso de uma bureta na solução de vanadato de amônio sob agitação constante à temperatura de 65°C. O precipitado obtido foi lavado com

água destilada e álcool absoluto por várias vezes, sendo posteriormente filtrado e seco em linha de vácuo por 10 horas.

Figura 5. Etapas da síntese do vanadato de prata nanoestruturado

4.2.2 Caracterização do Vanadato de Prata Nanoestruturado

A caracterização do vanadato de prata foi realizada para garantir uma padronização físico-química do material, possibilitando assim um trabalho dentro de cenários controlados e reprodutíveis. Para tanto, foram utilizadas as técnicas de difração de raios X (DRX), espectroscopia infravermelho com transformada de Fourier (IVTF), microscopia eletrônica de varredura e microanálise (MEV/EDS).

A análise de DRX foi realizada à temperatura ambiente utilizando-se um difratômetro Shimadzu XRD-7000 operando com radiação Cu K α ($\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$), 40kV e 30 mA. Os dados foram coletados em modo contínuo entre $10^\circ < 2\theta < 60^\circ$ com uma velocidade de 2° por minuto para identificação da estrutura cristalina.

Espectros de infravermelho com transformada de Fourier foram coletados em um espectrômetro FTLA 2000 – 102 usando modo de transmitância na região de $4000 \text{ a } 400 \text{ cm}^{-1}$. Antes das análises, as amostras foram diluídas e conformadas como pastilhas utilizando brometo de potássio (KBr) grau analítico.

Para finalizar, a análise morfológica foi realizada utilizando-se um microscópio eletrônico de varredura JEOL, JSM-6360LV acoplado a um sistema de análise

espectroscópica por energia dispersiva de raios X (EDS), que nos auxiliou na caracterização superficial do material sintetizado por meio de análise química qualitativa.

4.2.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do Nanomaterial

Inicialmente foi determinada a concentração inibitória mínima (CIM) do vanadato de prata nanoestruturado frente à *Candida albicans*, *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* pelo método das diluições sucessivas em placas de cultura celular (TPP, Trasadingen, Unterklettgau, Suíça) contendo 96 poços e em duplicata.

Os resultados foram analisados com base na turvação do meio, identificado a olho nu. Havendo turvação, o resultado foi considerado ineficiente para ação antimicrobiana do vanadato.

Como se sabe, a concentração inibitória mínima do material puro, não corresponde à mínima concentração inibitória do mesmo quando este é adicionado na estrutura de outro material. Desta forma, esta análise foi realizada para mostrar se o vanadato de prata nanoestruturado apresentava atividade frente aos micro-organismos propostos, porém a efetividade antimicrobiana das resinas incorporadas com o nanomaterial foi determinada pelo nível de atividade metabólica das células viáveis de acordo com o método do XTT, contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) e microscopia confocal à laser após a formação do biofilme (48 h).

4.2.4 Confeção dos Espécimes

Os espécimes utilizados nos ensaios microbiológicos e análise da dureza superficial foram confeccionados nas dimensões de 9 mm de diâmetro x 2 mm de altura e os espécimes para análise da resistência à compressão com 8 mm de altura x 4 mm de diâmetro.

Para as análises de rugosidade superficial, resistência à flexão e ao impacto as amostras apresentaram uma dimensão final de 65 mm de comprimento x 10 mm de largura x 3,3 mm de espessura.

Inclusão das Matrizes em Mufla Metálica

Os espécimes foram confeccionados a partir da inclusão de matrizes metálicas de mesmo formato e dimensão, para cada respectivo ensaio, em mufla metálica convencional (OGP, Produtos Odontológicos Ltda., São Paulo, SP, Brasil).

Figura 6. Matrizes metálicas utilizadas

Inicialmente uma camada de gesso pedra Tipo III (Gesso Rio, Orlando Antônio Bussioli ME, Rio Claro, SP, Brasil), espatulado mecanicamente na proporção de 30 mL de água para cada 100 g de pó, foi inserida na mufla metálica. Após a presa do gesso, a mufla foi preenchida com silicone de condensação densa Zetalabor® (Zhermarck, Labordental Ltda., São Paulo, SP, Brasil) e as matrizes envolvidas, exceto em uma das faces planas, e niveladas com uma lâmina de vidro. A seguir a contra- mufla foi posicionada e a inclusão finalizada com gesso tipo pedra III.

Figura 7. Inserção das matrizes em silicona

Durante a inclusão das matrizes para confecção dos espécimes a serem utilizados no ensaio de rugosidade superficial, resistência à flexão e ao impacto, o silicone de condensação não foi utilizado uma vez que as matrizes foram incluídas diretamente em gesso pedra Tipo IV (Gesso Rio, Orlando Antônio Bussioli ME, Rio Claro, SP, Brasil), para evitar qualquer tipo de distorção.

Figura 8. Moldes obtidos em mufla metálica

Prensagem

Após a abertura da mufla e remoção das matrizes, foi realizado o isolamento do gesso e do silicone com Cel-Lac (SSWhite, Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Em seguida, a prensagem da resina acrílica incorporada com as diferentes concentrações de vanadato de prata foi realizada.

Os espécimes foram divididos em seis grupos de acordo com as porcentagens do material: 0 (controle), 0,5%, 1%, 2,5%, 5% e 10%. A incorporação foi realizada respeitando a proporção recomendada pelo fabricante. A quantidade do material nanoestruturado foi calculada em proporção à massa de pó da resina acrílica. Primeiramente acrescentou-se o vanadato de prata ao pó da resina acrílica, após homogeneização, a quantidade de monômero suficiente para a massa final do polímero e vanadato foi acrescentada lentamente à mistura e o material foi manipulado manualmente de acordo com a prática clínica.

Tabela 2. Descrição das proporções entre polímero, vanadato e monômero para cada concentração.

Concentração	Polímero	Vanadato	Monômero
Controle	21 gr	-	10 mL
0,5%	20,89 gr	0,105 gr	10 mL
1%	20,79 gr	0,21 gr	10 mL
2,5%	20,47 gr	0,525 gr	10 mL
5%	19,95 gr	1,05gr	10 mL
10%	18,9 gr	2,1 gr	10 mL

Figura 9. Manipulação da resina acrílica

Durante a fase plástica, a resina foi acomodada nos moldes preparados nas muflas metálicas. As muflas foram então colocadas em prensas hidráulicas (Prensa hidráulica Protecni, Protecni Equip. Med., Araraquara, SP, Brasil) com carga de 1000 Kgf durante 60 minutos.

Figura 10. Prensagem da resina acrílica

Como diferença em relação à resina acrílica autopolimerizável, após permanecer na prensa hidráulica pelo mesmo período para acomodação da resina, a resina termopolimerizável foi polimerizada pelo método convencional em banho d'água por meio da termopolimerizadora automática Termociler 100 (Oficina de precisão, Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil) à 65°C por 1 hora, seguido por um estágio a 100°C por 30 minutos.

Figura 11. Termopolimerizadora

Desinclusão e Acabamento

Após a desinclusão, os excessos verificados nos espécimes foram removidos com uma fresa (Maxi-cut, Malleifer AS, Ballaiguer, Swetzerland) e os mesmos foram lixados com lixa

d'água Norton 400, 600 e 1200. As dimensões foram avaliadas por meio de um paquímetro digital (Mitutoyo®, Japão).

Figura 12. Politriz lixadeira metalográfica

Após o acabamento os corpos de prova foram armazenados em água destilada por 24 horas à 37°C. Os corpos de prova obtidos para cada ensaio encontram-se abaixo.

Figura 13. Corpos de prova para ensaios microbiológicos, dureza e compressão

Figura 14. Corpos de prova para ensaios de rugosidade superficial e resistência à flexão e ao impacto

4.2.5 Padronização da Rugosidade

Dependendo do tipo de polimento e confecção das próteses, a resina pode apresentar superfícies mais polidas com rugosidade superficial de 0,03 μm a 0,3 μm ou mais rugosas variando de 1,2 μm a 3 μm . De acordo com a literatura a maioria dos micro-organismos presentes na microbiota oral sobrevive, apenas, ao aderir a micro rugosidades superficiais sendo 0,2 μm o limiar para favorecimento da adesão de micro-organismos em materiais. Assim, para os ensaios microbiológicos os espécimes foram lixados e optou-se por padronizar a rugosidade através do Rugosímetro (Surftest SJ-201P, Mitutoyo Corporation, Japan) em 0,2 μm .

Uma vez padronizada a rugosidade, a superfície do material não influenciaria na adesão de biofilme e consequentemente nos resultados.

4.2.6 Esterilização

Os espécimes de cada grupo a serem utilizados para os ensaios microbiológicos foram acondicionados em envelopes especiais com uma face de plástico (Envelope Grau Cirúrgico Termo – selável, Sispack, SP, Brasil) e esterilizados por meio de óxido de etileno na ACECIL – Central de Esterilização Comércio e Indústria Lda – Campinas.

Figura 15. Espécimes esterilizados por meio de óxido de etileno

4.2.7 Avaliação da atividade antimicrobiana

Meios de Cultura Utilizados

Mueller Hinton Broth (HB)

Este meio de cultura foi utilizado para a preparação do inóculo microbiano e contaminação dos corpos de prova com *S. aureus* e *P. aeruginosa*. Para cada 21,0 g do meio de cultura desidratado Mueller Hinton Broth (HiMedia, Mumbai, India) foram adicionados 1000,00 mL de água destilada e esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos, segundo instruções do fabricante.

Mueller Hinton Agar (MHA)

Este meio de cultura foi utilizado para a semeadura da solução obtida dos corpos de prova contaminados com *S. aureus* e *P. aeruginosa*. Para cada 38 g do meio de cultura desidratado Mueller Hinton (HiMedia, Mumbai, India) foram adicionados 1000,00 mL de água destilada e esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos, segundo instruções do fabricante.

Sabouraud Dextrose Broth (SDB)

Este meio de cultura foi utilizado para a preparação do inóculo microbiano e contaminação dos corpos de prova com *Candida albicans*. Para cada 30,0 g do meio de cultura desidratado Sabouraud Dextrose (HiMedia, Mumbai, India) foram adicionados 1000,00 mL de água destilada e esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos, segundo instruções do fabricante.

Sabouraud Dextrose Agar (SDA)

Este meio de cultura foi utilizado para a semeadura da solução obtida dos corpos de prova contaminados com *Candida albicans*. Para cada 65,0 g do meio de cultura desidratado Sabouraud Dextrose Agar (HiMedia, Mumbai, India) foram adicionados 1000,00 mL de água destilada e esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos, segundo instruções do fabricante.

SB 20 –modificado

Este meio de cultura foi utilizado para a preparação do inóculo microbiano e contaminação dos espécimes com *S. mutans*. Para o preparo foram adicionados 15 g de casitona (HiMedia, Mumbai, India), 5 g de extrato de levedura (HiMedia, Mumbai, India), 0,2 g de cisteína (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil), 0,1 g de sulfito de sódio (Chemco, Hortolândia, Brasil), 20 g de acetato de sódio (Dinâmica, Diadema, Brasil), 200 g de sacarose (Dinâmica, Diadema, Brasil) em 1000,0 mL de água destilada e esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos, segundo instruções do fabricante.

Micro-organismos e Condição de Crescimento

Os ensaios de XTT e contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) foram realizados frente a todas as concentrações (controle; 0,5%; 1%; 2,5%; 5% e 10%). Para cada concentração, foram obtidos $n = 8$ espécimes para cada resina frente a cada micro-organismo. Totalizando 384 espécimes.

A análise por microscopia confocal à laser foi realizada para o grupo controle e para as 3 concentrações que mostraram melhor atividade nos ensaios anteriores, ou seja, 2,5%; 5% e 10%. O estudo foi realizado em duplicata para cada micro-organismo, totalizando 64 espécimes.

Para o preparo do inóculo, os micro-organismos foram semeados em placa de Petri sobre o meio de cultura específico e incubados a 37°C por 48 horas.

A seguir, para a padronização dos inóculos, uma alçada dos micro-organismos recém-cultivados foi adicionada à solução salina a 0,85%. A turvação da suspensão microbiana foi verificada por meio da escala 0,5 de McFarland (10^8 UFC/mL para as bactérias e 10^6 UFC/mL para a levedura) e obtidas por meio do espectrofotômetro PCB 687 (BYK Gardner), com a leitura da absorbância entre 0,08 a 0,1 em comprimento de onda de 625 nm.

Desenvolvimento do Biofilme

Assepticamente, em câmara de fluxo laminar (Pachane, pa 400 – ECO, Piracicada, São Paulo, Brasil) o biofilme dos micro-organismos foi formado em placas de cultura pré-estéreis de 24 orifícios. Os espécimes foram distribuídos em cada poço e 1 alíquota de 1 mL do meio de cultura inoculado foi transferida para cada orifício.

As placas foram incubadas a 37°C por 1 h e 30 minutos sob agitação de 750 rpm em estufa bacteriológica (Incubadora Shaker, Mod. – CE-320, Cienlab, Campinas, SP, Brasil) para aderência do biofilme nos corpos de prova. Após o período de adesão, os corpos de prova foram lavados cuidadosamente com 2 mL de solução salina a 0,85% com a finalidade de remover as células não aderidas, tamponar o meio e remover os metabólitos.

Figura 16. Incubadora Shaker

Em seguida, 2 mL de meio de cultura estéril foram adicionados em cada poço com o objetivo de oferecer mais nutrientes aos micro-organismos. As placas foram incubadas a 37°C sob agitação de 750 rpm por 48 h para a maturação do biofilme.

Figura 17. Biofilmes formados

Decorrido esse período, os espécimes foram retirados das placas de 24 poços, lavados 1 vez com solução salina e inseridos separadamente em tubos de ensaio contendo 3 mL de solução salina, devidamente identificados.

O conjunto tubo de ensaio/corpo de prova foi levado a uma cuba de ultrassom (Altsonic, Clean 9CA, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil) por 20 minutos, para que houvesse o desprendimento dos micro-organismos.

Figura 18. Tubo/corpo de prova no ultrassom

Ensaio de XTT

A viabilidade do biofilme foi avaliada pelo ensaio de redução de XTT. Para o ensaio foi utilizado o XTT Cell Viability Assay Kit (Uniscience, São Paulo, Brasil), esse kit é composto pela solução XTT e pelo reagente de ativação.

Alíquotas de 100 μ L da suspensão homogeneizada de cada tubo e 50 μ L da solução de XTT [2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolio- 5- carboxanilida] foram transferidas para cada poço da placa de 96 poços. As placas foram incubadas no escuro a 37°C durante 24 horas para posterior quantificação da formação de formazan por espectrofotometria a 492 nm utilizando um leitor de microplacas (Synergy II, BioTek Instruments, Winooski, VT, Estados Unidos).

Figura 19. XTT Cell Viability Assay Kit

Unidades Formadoras de Colônias

O número de células viáveis foi quantificado em termos de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL). Para a realização da semeadura dos meios de cultura específicos em placas de Petri, para cada micro-organismo, a solução contida nos tubos de ensaio foi diluída de forma seriada. Para isso, os tubos foram individualmente agitados em agitador de tubos de ensaio (Phoenix, AP 56, Araraquara, São Paulo, Brasil), uma alíquota de

25 μL da solução foi utilizada sem diluição e posteriormente, uma alíquota de 25 μL foi transferida para um eppendorf contendo 250 μL de solução salina à 0,85%, obtiveram-se assim diluições seriadas de 10^0 a 10^{-3} .

Figura 20. Esquema do método de diluição para contagem das unidades formadoras de colônias

Uma alíquota de 25 μL de cada diluição foi transferida à placa de Petri nos respectivos quadrantes e espalhada sobre o meio de cultura com o auxílio de uma alça Drigalsky.

Figura 21. Diluição em placas de Petri

Em seguida, as placas foram incubadas à 37°C por 24 horas em estufa bacteriológica. A incubação do *S. mutans* foi em microaerofilia.

Após o período de incubação, foi realizada a contagem e registro do número de UFC. Para o cálculo considerou-se a diluição em que o número de UFC variou entre 30 a 300 colônias e foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{UFC/10 mL} = (\text{número de colônias} \times 10^n/q) \times 10$$

Onde, n equivale ao valor absoluto da diluição (1, 2 ou 3), e q equivale à quantidade em mL, pipetada para cada diluição quando nas semeaduras das placas. No presente estudo, $q=0,025$ já que foram 25 μL para cada diluição. A média das 8 placas de cada grupo foi utilizada como valor final de contagem.

Microscopia Confocal à Laser

A análise qualitativa dos biofilmes (48h) foi realizada para o grupo controle e para as amostras incorporadas com 2,5%; 5% e 10% do nanomaterial.

Concluído o período de desenvolvimento do biofilme nos espécimes, foi realizada a lavagem em 2 mL de solução salina a 0,85%. Em seguida, cada espécime foi transferido a um poço da placa de 24 poços. Para o preparo do corante, foram adicionados 1,5 μL da solução do componente A e 1,5 μL da solução do componente B a 0,97 mL de solução salina a 0,85%, conferindo 0,3% de concentração à mistura.

Os espécimes foram corados com 300 μL da solução Live/Dead® BacLight™ L 7007 (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, EUA), gotejada sobre o biofilme e incubados por 15 minutos ao abrigo de luz a temperatura ambiente para que houvesse a difusão dos fluorocromos no biofilme. A seguir os espécimes foram enxaguados uma vez com solução salina para remoção do excesso de corante e 2 espécimes foram cuidadosamente montados em lamínula de vidro associada a óleo de imersão, com a face a ser avaliada voltada para baixo, para análise do biofilme em microscópio confocal Leica TCS – SPE (Leica Microsystems, Mannheim, Alemanha). Uma imagem de cada grupo foi capturada com o Microscópio Confocal de Varredura à Laser (CSLM; Leica Microsystemns CMS, Mannheim, Alemanha) com aumento de 63 x.

Figura 22. Processamento das imagens digitais pelo software LAS AF Lite.

4.2.8 Ensaios Mecânicos

Foram realizados cinco ensaios mecânicos para avaliar o desempenho do material: análise da dureza e rugosidade superficial, ensaios de resistência à flexão, à compressão e ao impacto.

Os ensaios foram realizados frente aos 6 grupos obtidos (0% - controle; 0,5%; 1%; 2,5%; 5%; 10%), com exceção ao ensaio de resistência ao impacto que foi realizado apenas com o grupo controle e com os grupos incorporados com 5% e 10% do nanomaterial, que apresentaram melhores resultados nos ensaios antimicrobianos. Para todos os testes utilizou-se $n=10$.

Dureza Superficial

A análise da dureza superficial foi realizada por meio do Microdurômetro (Shimadzu HMV-2000, Japão). Foram realizadas 3 medições aleatoriamente equidistantes em cada corpo de prova por meio de um penetrador tipo Knoop com carga de 25 gf por 5 segundos. As indentações foram medidas através de duas marcas nos vértices do losango em uma imagem com aumento de 40x, determinando o comprimento da diagonal maior e, por conseguinte, os resultados de dureza Knoop por meio do cálculo automático feito pelo software do equipamento.

Figura 23. Microdurômetro da marca Shimadzu, modelo HMV-2000

Rugosidade Superficial

A preparação dos corpos de prova para o ensaio de rugosidade superficial foi de acordo com a norma técnica ISO 20795-1:2008 e a análise de acordo com a norma técnica ABNT NBR ISO 4287:2002.

Esta análise foi feita por meio do rugosímetro SJ. 201P (Mitutoyo Corporation, Japão), que opera com uma ponta analisadora de superfície capaz de medir até 100 mm de percurso, apresentando uma base de granito com baixo potencial de dilatação, evitando a descalibragem do aparelho.

A ponta analisadora do rugosímetro tocou na peça e percorreu uma distância de 4mm fazendo três medições em cada corpo de prova no sentido do seu maior diâmetro.

Figura 24. Rugosímetro SJ. 201P

Resistência à Flexão

De acordo com a ISO 20795-1:2008, os espécimes foram confeccionados nas dimensões de 65 mm x 10 mm x 3,3 mm. Um teste de flexão de três pontos foi realizado utilizando a máquina universal de ensaios (EMIC DL 2000, São José dos Pinhais, Paraná, Brasil), a uma velocidade de 5 mm/min e carga de 20 kgf. A resistência à flexão em Mpa foi calculada.

Figura 25. Ensaio de resistência à flexão

Resistência à Compressão

Os espécimes foram confeccionados com 4mm de diâmetro e 8 mm de altura de acordo com a norma ISO 604. Para o ensaio foi utilizada a máquina universal de ensaios (EMIC DL 2000, São José dos Pinhais, Paraná, Brasil) com carga de 2000 kgf e velocidade de 0,5 mm/min. As amostras foram posicionadas de modo que a carga de compressão fosse aplicada ao longo eixo.

Figura 26. Ensaio de resistência à compressão

Resistência ao Impacto

Os corpos de prova e os ensaios de resistência ao impacto foram realizados de acordo com a norma ASTM D256. Para o ensaio foi utilizada a máquina (AIC – EMIC, São José dos Pinhais, Paraná, Brasil) utilizando o sistema Izod com pêndulo de 2J.

Figura 27. Máquina de resistência ao impacto AIC

4.2.9 Ensaios de Caracterização Físico-Química

A caracterização das resinas acrílicas quanto à dispersão da carga utilizada foi realizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para isso, as amostras foram recobertas pela vaporização de uma fina camada de ouro tornando a superfície condutora de elétrons, sendo posteriormente analisadas em um microscópio FEI Magellan 400 L acoplado a um sistema de análise espectroscópica por energia dispersiva de raios X (EDS), que auxiliou na caracterização superficial das amostras por meio de análise química qualitativa.

4.2.10 Análise dos Dados

Verificada a distribuição normal (teste de Levene) e homogênea (Teste de Shapiro-Wills) dos dados, foram aplicados os testes Two-Way Anova e Tukey-HSD. Foram considerados como fatores de variação as resinas e as concentrações. Apenas para o ensaio de resistência à compressão a distribuição dos dados não foi normal, sendo assim aplicou-se o teste Generalized Linear Models. Para todas as análises o valor de $p < 0.05$ foi considerado significativo.

5 Resultados

5.1 Caracterização do Vanadato de Prata

Pelo difratograma de raios X mostrado na Figura 28, é possível observar a formação do vanadato de prata, β -AgVO₃, indexado pela ficha cristalográfica (JCPDS 29-1154). Utilizando o método descrito por Krimm e Tobolsky, 1951, o índice de cristalinidade da amostra foi estimado em 67% em função do *background* exibido pelo difratograma. Isso indica que a amostra não é totalmente cristalina, contendo 33% de fase amorfa. É importante mencionar que os picos de difração localizados em $2\theta = 37,79$ e $44,10$ correspondem à presença de nanopartículas de prata metálica, Ag⁰ (JCPDS 87-597), que se formaram na superfície dos cristais (Holtz et al., 2010; Holtz et al., 2012).

Figura 28. Difratograma de raios X do vanadato de prata nanoestruturado

Os espectros na região do infravermelho do β -AgVO₃ em comparação com o precursor vanadato de amônio são mostrados na Figura 29. As principais bandas observadas são aquelas situadas entre 400-1000 cm⁻¹, sendo a maioria delas atribuídas às ligações entre os átomos de oxigênio e vanádio. No espectro, a banda localizada em 1633 cm⁻¹ corresponde à vibração da ligação –OH da molécula de água.

Figura 29. Espectros IVTF do vanadato de prata nanoestruturado e do vanadato de amônio

A banda forte observada em 1409 cm^{-1} no vanadato de amônio é atribuída à deformação simétrica N–H. Essa banda desaparece completamente no espectro do $\beta\text{-AgVO}_3$, indicando a ocorrência de sua formação. Isso também pode ser evidenciado pela intensificação da banda em torno de 849 cm^{-1} , que é associada tanto à vibração de estiramento V–O quanto ao modo de vibração da ligação Ag–O–V (Holtz et al., 2010; Liu e Tang, 2009). As bandas localizadas em 965 , 925 , 896 e 653 cm^{-1} no espectro do $\beta\text{-AgVO}_3$ são atribuídas ao estiramento V=O, enquanto a banda situada em 501 cm^{-1} pode ser associada ao modo de vibração V–O. A presença das bandas na região de 940 a 775 cm^{-1} também sugere a presença de grupos vanadatos poliméricos (Dall'Acqua, 1998).

Assim como a água, a presença da prata no sistema também afeta o modo de vibração das ligações metal–oxigênio, contribuindo para o deslocamento de algumas bandas em relação ao espectro do vanadato de amônio. Isso pôde ser observado principalmente para as bandas localizadas na região de 700 cm^{-1} .

A morfologia do vanadato de prata sintetizado, bem como a sua microanálise é mostrada na Figura 30. É possível observar que os cristais de $\beta\text{-AgVO}_3$ formados apresentaram geometria acicular (que tem feitiço de agulha), com diâmetro médio de 100 nm e comprimento da ordem de micrômetros.

Figura 30. Micrografia eletrônica de varredura e espectro de EDS do vanadato de prata 20.000x

No espectro de EDS mostrado na Figura 30 é possível identificar a presença dos elementos prata (Ag) e vanádio (V), o que é coerente com a formulação estabelecida para a síntese dos materiais. O pico localizado em 0,28 keV é atribuído ao elemento carbono (C), utilizado na forma de fita apenas para fixar a amostra no suporte do microscópio. Ainda é importante mencionar que antes das análises, as amostras foram recobertas pela vaporização de uma fina camada de ouro (Au) tornando a superfície condutora de elétrons, o que justifica a presença desse elemento no espectro.

5.2 Concentração Inibitória Mínima do Nanomaterial Puro

A Tabela 3 mostra os resultados da concentração inibitória mínima (CIM) do vanadato de prata nanoestruturado puro.

O valor de CIM contra as estirpes de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* foi de 31,25 µg/mL; para *Candida albicans* foi de 62,5 µg/mL e *Streptococcus mutans*, 250 µg/mL. Estes valores são importantes uma vez que demonstram a eficácia antimicrobiana de vanadato de prata contra leveduras, bactérias gram-negativas e gram-positivas responsáveis por problemas orais associados com próteses dentárias.

Tabela 3. Padrão dos micro-organismos utilizados nos ensaios microbiológicos e valores de CIM para Vanadato de prata nanoestruturado

	Micro-organismo	Cepa	Características	CIM (µg/mL)
Ca	<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231	Levedura gram-positiva	62,5
Sm	<i>Streptococcus mutans</i>	ATCC 25175	Coco gram-positivo	250
Sa	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	Coco gram positivo	31,25
Pa	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	Bacilo gram-negativo	31,25

5.3 Atividade Antimicrobiana das Resinas Modificadas

5.3.1 XTT

O efeito da incorporação do nanomaterial sobre a viabilidade dos biofilmes, avaliado pelo ensaio de redução de XTT encontra-se descrito a seguir, de acordo com a leitura da alteração colorimétrica.

Candida albicans

A Figura 31 mostra que, para ambas as resinas ($p=0,368$), a incorporação de 5 e 10% do nanomaterial reduziu significativamente a atividade metabólica de *Candida albicans*, sendo estes grupos semelhantes entre si ($p=0,971$) e diferentes do grupo controle ($p<0,05$). As demais concentrações apresentaram resultados intermediários, sem diferenças significantes entre si ($p>0,05$).

Figura 31. Análise comparativa da absorbância do XTT – *Candida albicans*

Streptococcus mutans

Para ambas as resinas ($p=0,429$), a incorporação de 10% de vanadato de prata promoveu a menor atividade metabólica de *S. mutans* ($p=0,023$). As concentrações de 1%, 2,5% e 5% apresentaram resultados intermediários e a maior atividade metabólica foi observada no grupo incorporado com 0,5%, seguido pelo grupo controle, sendo ambos estatisticamente semelhantes ($p=1,000$).

Figura 32. Análise comparativa da absorbância do XTT – *Streptococcus mutans*

Staphylococcus aureus

Comparando-se as diferentes concentrações ($p=0,108$) para ambas as resinas ($p=0,244$) observa-se que não houve diferença na atividade antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus*.

Figura 33. Análise comparativa da absorbância do XTT – *Staphylococcus aureus*

Pseudomonas aeruginosa

Comparando-se as diferentes concentrações para ambas as resinas, nota-se que a incorporação de 5 e 10% do nanomaterial promoveu melhores resultados antimicrobianos uma vez que houve menor atividade metabólica ($p<0,05$), essas concentrações foram estatisticamente semelhantes entre si ($p=1,000$). O grupo incorporado com 2,5% de vanadato de prata apresentou resultados intermediários, enquanto que os grupos controle, 0,5% e 1% apresentaram similaridade estatística ($p>0,05$).

Figura 34. Análise comparativa da absorbância do XTT – *Pseudomonas aeruginosa*

5.3.2 Unidades Formadoras de Colônias

A seguir seguem as análises da quantificação do número de células viáveis em termos de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL).

Candida albicans

A contagem de unidades formadoras de colônias de *Candida albicans* mostrou de acordo com a Figura 35 que, para ambas as resinas ($p=0,431$), a incorporação de 10% de vanadato de prata reduziu significativamente o número de UFC/mL ($p=0,000$). Os demais grupos apresentaram semelhança estatística ($p>0,05$).

Figura 35. Análise comparativa das unidades formadoras de colônias (UFC/mL) – *Candida albicans*

Streptococcus mutans

Para *S. mutans*, a incorporação de 10 e 5% do nanomaterial resultou no menor número de UFC/mL para ambas as resinas ($p=0,671$), sendo estes grupos semelhantes entre si ($p>0,05$) e diferentes dos demais ($p<0,05$). O grupo incorporado com 2,5% do nanomaterial apresentou-se diferentes dos demais, com resultados intermediários, e não houve diferença entre os grupos com 1%; 0,5% e controle.

Figura 36. Análise comparativa das unidades formadoras de colônias (UFC/mL) – *Streptococcus mutans*

Staphylococcus aureus

Comparando-se as diferentes concentrações para ambas as resinas ($p=0,187$), nota-se que os grupos incorporados com 5 e 10% do nanomaterial apresentarem o menor número de unidades formadoras de colônia (UFC/mL), sendo semelhantes entre si ($p>0,05$) e diferentes dos demais ($p<0,05$).

Figura 37. Análise comparativa das unidades formadoras de colônias (UFC/mL) – *Staphylococcus aureus*

Pseudomonas aeruginosa

Para ambas as resinas ($p=0,978$), as concentrações de 5 e 10% apresentarem o menor número de unidades formadoras de colônia (UFC/mL), sendo semelhantes entre si ($p>0,05$) e diferentes das demais ($p<0,05$).

Figura 38. Análise comparativa das unidades formadoras de colônias (UFC/mL) – *Pseudomonas aeruginosa*

5.3.3 Microscopia Confocal à Laser

As imagens obtidas por meio da análise qualitativa dos biofilmes (48h) utilizando-se o Microscópio Confocal de Varredura à Laser (CSLM; Leica Microsystemns CMS, Mannheim, Alemanha) com aumento de 63 x encontram-se a seguir.

É possível observar para todos os micro-organismos uma maior densidade de células e em maior proporção na cor verde, no grupo controle em comparação com os demais. A mudança da viabilidade celular (maior proporção de fluorescência vermelho/verde) em amostras contendo o nanomaterial pode ser observada, assim como a redução no número de células, havendo maior quantidade de espaços negros entre elas de forma que nas amostras contendo 10% do aditivo uma inibição quase completa foi observada.

Figura 39. Imagem do biofilme de *Candida albicans* resina autopolimerizável (RA); resina termopolimerizável (RT): A- RA controle; B- RA 2,5%; C –RA 5%; D- RA 10%; E – RT controle; F- RT 2,5%; G- RT 5%; H – RT 10%.

Figura 40. Imagem do biofilme de *Streptococcus mutans* resina autopolimerizável (RA); resina termopolimerizável (RT): A- RA controle; B- RA 2,5%; C –RA 5%; D- RA 10%; E – RT controle; F- RT 2,5%; G- RT 5%; H – RT 10%.

Figura 41. Imagem do biofilme de *Staphylococcus aureus* resina autopolimerizável (RA); resina termopolimerizável (RT): A- RA controle; B- RA 2,5%; C –RA 5%; D- RA 10%; E – RT controle; F- RT 2,5%; G- RT 5%; H – RT 10%.

Figura 42. Imagem do biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* resina autopolimerizável (RA); resina termopolimerizável (RT): A- RA controle; B- RA 2,5%; C –RA 5%; D- RA 10%; E – RT controle; F- RT 2,5%; G- RT 5%; H – RT 10%.

5.4 Análises mecânicas

5.4.1 Dureza Superficial

Os resultados obtidos no ensaio de dureza superficial são apresentados na Tabela 4.

Para a resina autopolimerizável a incorporação de 0,5% em peso do vanadato de prata resultou em um aumento significativo nos valores de dureza superficial ($26,14 \pm 5,13$) quando comparado aos demais grupos ($p=0,000$). A dureza superficial da resina acrílica termopolimerizável permaneceu inalterada após a incorporação do nanomaterial ($p=1,000$). Ao comparar as duas resinas observou-se diferença significativa apenas nas concentrações de 0,5% e 10% ($p=0,023$).

Tabela 4. Média(DP) da dureza superficial das resinas incorporadas com vanadato de prata nanoestruturado

	<i>Controle</i>	<i>0,5%</i>	<i>1%</i>	<i>2,5%</i>	<i>5%</i>	<i>10%</i>
Auto	16,88 (2,0) ^{ABa}	26,14 (5,13) ^{Ca}	19,23 (1,41) ^{Aa}	17,85 (2,11) ^{ABa}	17,05 (1,82) ^{ABa}	15,65 (1,61) ^{Ba}
Termo	16,62 (1,01) ^{Aa}	17,87 (2,55) ^{Ab}	18,06 (1,5) ^{Aa}	17,88 (1,82) ^{Aa}	17,89 (2,33) ^{Aa}	18,51 (2,21) ^{Ab}

*Letras minúsculas - comparação entre linhas

*Letras maiúsculas - comparação entre colunas

*Letras iguais – igualdade estatística

5.4.2 Rugosidade Superficial

Como mostra a Figura 43, em relação a rugosidade superficial, não houve diferença significativa em função da resina ($p=0,209$) ou da concentração de vanadato de prata ($p=0,751$).

Figura 43. Rugosidade superficial (μ m) e desvio padrão das resinas acrílicas contendo β -AgVO₃.

5.4.3 Resistência à Flexão

Como mostra na Figura 44, para ambas as resinas ($p=0,446$), a incorporação de 10%, 5% e 2,5%, em peso do vanadato de prata, resultou em uma diminuição significativa ($p=0,000$) nos valores de resistência à flexão quando comparado ao grupo controle que, por sua vez, apresentou resultados semelhantes aos grupos com 1% ($p=1,000$) e 0,5% ($p=0,847$).

Figura 44. Resistência à flexão (MPa) e desvio padrão das resinas acrílicas contendo β -AgVO₃.

5.4.4 Resistência à Compressão

De acordo com a Tabela 5, para a resina autopolimerizável não houve diferença significativa na resistência à compressão dos grupos incorporados com vanadato de prata nanoestruturado em relação ao controle ($p>0,05$). A resistência à compressão da resina termopolimerizável reduziu significativamente com a incorporação de 0,5% e 10% em massa do nanomaterial ($p<0,05$). Ao comparar as duas resinas observou-se diferença significativa de forma que a resina termopolimerizável apresentou os menores valores para todos os grupos ($p<0,05$).

Tabela 5. Média(DP) da resistência à compressão das resinas incorporadas com vanadato de prata nanoestruturado

	<i>Controle</i>	<i>0,5%</i>	<i>1%</i>	<i>2,5%</i>	<i>5%</i>	<i>10%</i>
Auto	103,59 (8,89) ^{ABa}	119,34 (5,72) ^{Aa}	99,67 (10,21) ^{Ba}	111,57 (6,08) ^{ABa}	100,11 (8,44) ^{Ba}	103,65 (9,44) ^{ABa}
Termo	73,48 (6,01) ^{Ab}	49,31 (7,69) ^{Bb}	62,85 (11,02) ^{Ab}	65,90 (6,36) ^{Ab}	62,86 (7,20) ^{Ab}	52,78 (9,20) ^{Bb}

*Letras minúsculas - comparação entre linhas

*Letras maiúsculas - comparação entre colunas

*Letras iguais – igualdade estatística

5.4.5 Resistência ao Impacto

Comparando-se as diferentes concentrações para ambas as resinas, a incorporação de 10% do nanomaterial promoveu maior redução na resistência ao impacto em relação à concentração de 5%. As duas concentrações promoveram redução significativa em relação ao controle ($p=0,000$).

Ao comparar as resinas entre si, observou-se diferença significativa ($p=0,000$) de forma que a resina termopolimerizável apresentou maiores valores de resistência ao impacto nos grupos controle e 10%, enquanto que a resina autopolimerizável apresentou propriedades superiores no grupo com 5%.

Tabela 6. Média(DP) da resistência ao impacto (J/m) das resinas incorporadas com vanadato de prata nanoestruturado

	<i>Controle</i>	<i>5%</i>	<i>10%</i>
Auto	157,70 (9,14) ^{Aa}	70,60 (4,16) ^{Ba}	51,10 (5,89) ^{Ca}
Termo	174,70 (16,50) ^{Ab}	67,90 (6,62) ^{Bb}	53,50 (5,89) ^{Cb}

*Letras minúsculas - comparação entre linhas

*Letras maiúsculas - comparação entre colunas

*Letras iguais – igualdade estatística

5.5 Padrão de Incorporação do Vanadato de Prata nas Amostras

Comparando as resinas com diferentes teores de β -AgVO₃, é possível verificar que independentemente do teor incorporado sempre existe a presença de domínios de β -AgVO₃ ao longo da matriz seguindo um padrão circular. No entanto, o número de domínios sofre um aumento nas resinas com maiores teores de β -AgVO₃.

Figura 45. Morfologia (500x) e análise química das resinas acrílicas: RA- Resina autopolimerizável; RT- Resina termopolimerizável (continua).

Figura 46. Morfologia (500x) e análise química das resinas acrílicas: RA- Resina autopolimerizável; RT- Resina termopolimerizável (continuação).

6 Discussão

Estudos registram uma marcante redução no número de dentes perdidos, porém, entre os idosos acima de 65 anos, o Brasil ainda apresenta prevalência de edentulismo dentre as mais altas do mundo (Peres et al., 2013). Assim, as presentes estimativas destacam que as taxas de crescimento da população mundial, juntamente com a expectativa de vida prolongada pode levar a uma crescente demanda por próteses dentárias (Montero et al., 2013).

O principal objetivo do tratamento protético é melhorar a qualidade de vida do paciente, restaurando dentes perdidos, no entanto, o uso destes dispositivos pode favorecer a colonização de espécies microbianas em sua superfície, levando a problemas clínicos significativos (Sato et al., 2013; Valentini et al., 2013; Takahashi et al., 2014).

A colonização microbiana está relacionada a fatores tais como a estrutura e composição do material da superfície e propriedades das células microbianas (Skupien et al., 2013). Além disso, a limpeza da prótese pode ser de difícil execução para pacientes geriátricos que apresentam deficiência cognitiva, destreza motora reduzida e perda de memória (Pesci-Bardon et al., 2006). Assim, a necessidade de desenvolver um sistema simples e eficaz de cuidados com a prótese existe e uma resina acrílica com propriedades antimicrobianas poderia proporcionar um avanço significativo na prevenção de doenças e melhorarias na higiene oral.

Para esta finalidade, várias substâncias têm sido incorporadas em resinas acrílicas utilizadas na confecção de próteses e outros materiais odontológicos (Skupien et al., 2013). Estas incluem agentes antifúngicos (Fan et al., 2011; Redding et al., 2009), anti-sépticos (Amin et al., 2009), monômeros antimicrobiano (Regis et al., 2012) e materiais à base de prata (Acosta-Torres et al., 2012). No entanto, apesar de alguns compostos apresentarem bons resultados em termos antimicrobianos, não há evidências de confiança na literatura que forneça uma verdadeira recomendação sobre a adição dos mesmos. Assim, uma avaliação da eficácia real do material, incluindo a concentração terapêutica ótima que não deteriore as propriedades mecânicas do substrato e não produza efeitos tóxicos sobre a cavidade oral é necessária (Paleari et al., 2011; Pesci-Bardon et al., 2006; Skupien et al., 2013).

A prata possui um longo histórico de aplicação e é conhecida por sua superioridade em relação a outros metais e não-metais, em termos de propriedades antimicrobianas. Estas propriedades são aumentadas quando preparadas na forma de nanopartículas. Estudos mostram que os derivados de prata são altamente tóxicos para os micro-organismos, mas produzem baixa toxicidade para os seres humanos quando em doses adequadas (Cheng et al., 2013; Khurana et al., 2013). Ainda, há relatos na literatura de que materiais dentários incorporados com agentes antimicrobianos perdem sua eficácia rapidamente quando expostos

na cavidade oral (Acosta-Torres et al., 2012; Skupien et al., 2013) porém, compostos à base de prata são biologicamente seguros e eficazes e podem promover atividade por maior tempo devido à liberação lenta dos íons (Yu et al., 2008).

Contudo, apesar das nanopartículas de prata possuírem aplicações técnicas e vantagens diversas, quando utilizadas sozinhas apresentam um problema comum; a aglomeração das nanopartículas (Shameli et al., 2011) além de proporcionar aos materiais uma coloração acinzentada que inviabiliza seu uso na odontologia uma vez que compromete a estética dos dentes. Assim, na tentativa de ampliar o uso desses materiais e melhorar alguns problemas que lhe são inerentes, recentemente foi desenvolvido o vanadato de prata nanoestruturado decorado com AgNPs (β -AgVO₃), inicialmente para ser utilizado na área médica e hospitalar, como em tintas à base d'água com o objetivo de controlar as infecções hospitalares (Holtz et al., 2012).

O presente trabalho propôs de forma inédita a incorporação deste material em resinas acrílicas odontológicas. Todo o processo de funcionalização das resinas com β -AgVO₃ teve como objetivo promover, por meio de um método simples de manipulação, comumente utilizado na prática odontológica, uma boa dispersão das partículas ao longo da matriz polimérica conferindo-lhes atividade antimicrobiana e ao mesmo tempo melhorando as propriedades mecânicas.

Uma vez combinadas com β -AgVO₃, as resinas poderiam potencialmente proporcionar resultados satisfatórios visto que de acordo com a literatura este material apresenta uma elevada atividade anti-bacteriana (Holtz et al., 2012) e funciona como um suporte para as nanopartículas de prata (AgNPs) que ao entrar em contato com o micro-organismo, altera sua morfologia e metabolismo levando à morte celular (Ozak; Ozkan, 2013).

O β -AgVO₃ também apresenta a característica de reduzir a perda de nanopartículas de prata por meio de lixiviação e tem a forma de uma meada de fio com dimensões nanométricas (Holtz et al., 2010) que poderia aderir à superfície da resina acrílica mais facilmente do que apenas as AgNPs. Ainda, de acordo com a literatura, promove uma elevada dispersão de nanopartículas de prata em nanofios de vanadatos de prata, o que é importante para manter uma grande área de superfície com os micro-organismos patogênicos, podendo promover maior efeito e durabilidade da ação antimicrobiana (Holtz et al., 2012). É importante ressaltar também que sua coloração amarelada se aproxima mais à cor dos elementos dentais.

No presente estudo, métodos de análise da viabilidade celular por ensaio de redução de XTT, contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) e análise qualitativa por

microscopia confocal à laser (CLSM), foram utilizados para avaliar a atividade antimicrobiana das resinas modificadas.

Dentre os micro-organismos, foi selecionada a levedura *C. albicans* importante na instalação e desenvolvimento da estomatite protética, condição prevalente em 11-67% dos usuários de próteses totais (Huh et al., 2014). *S. mutans*, coco gram-positivo, que possui grande capacidade de adesão ao dente e materiais restauradores, considerado o agente patogênico mais importante no desenvolvimento de cáries dentárias (Dong; Zhang, 2009). *S. aureus*, coco gram-positivo, que associado à redução da função do sistema imunológico pode levar a infecções sistêmicas graves e virulentas, como a pneumonia por aspiração (Taylor, 2013). *P. aeruginosa*, bacilo gram-negativo, que assim como *S. aureus*, pode conduzir a infecções oportunistas associadas a diminuição na função imunitária (Paranhos et al., 2009).

Assim como em estudos envolvendo outros compostos antimicrobianos, o efeito antimicrobiano das resinas modificadas foi dependente da dose (Pesci-Bardon et al., 2006; Marra et al., 2012). Na análise do metabolismo celular pelo método do XTT observou-se um declínio no metabolismo de *C. albicans* e *P. aeruginosa* com a incorporação de 5 e 10% de β -AgVO₃ e de *S. mutans* com 10%. Porém não houve alteração no metabolismo de *S. aureus*, independente da concentração utilizada.

A contagem de unidades formadoras de colônias mostrou uma redução significativa no número de micro-organismos viáveis quando da incorporação do nanomaterial nas porcentagens de 5 e 10% para *S. mutans*, *P. aeruginosa* e *S. aureus* e 10% para *C. albicans*. Nota-se que não houve uma completa correlação entre as metodologias anteriores, isso pode ser explicado pela sensibilidade de cada técnica e característica de cada micro-organismo, porém, de maneira geral, quanto maior a porcentagem de vanadato, maior foi a atividade antimicrobiana.

A análise auxiliar de CLSM complementou qualitativamente as análises anteriores mostrando uma redução na formação de biofilme dependente da dose. Quanto maior a concentração do nanomaterial incorporado ao polímero, mais áreas negras foram observadas denotando menor quantidade de micro-organismos, sendo estes em sua maioria não viáveis. Porém, vale ressaltar que nas imagens obtidas muitas vezes foi difícil a delimitação das áreas de células viáveis e de células não viáveis. Ao se sobreporem, na maioria das amostras observamos tonalidades intermediárias ao verde e ao vermelho, como cor amarela, por exemplo. Inclusive nos grupos controle, foi possível observar certa quantidade de células mortas, isso pode ser explicado pelo fato de que quando o biofilme atinge uma determinada

massa crítica e o equilíbrio dinâmico é alcançado, na ausência de nutrientes e/ou oxigênio inicia-se um processo de morte celular (Chen et al., 2013). Isso pode ter ocorrido uma vez que a formação de biofilme foi realizada sem o suplemento nutricional (Silva et al., 2008).

Outra dificuldade observada durante esta análise esteve relacionada à obtenção e focalização das imagens, bem como na obtenção de biofilmes espessos, isso pode ser explicado pela lisura superficial dos espécimes e pelo próprio método empregado, no qual o microscópio utilizado captura as imagens de baixo para cima, exigindo que a superfície à qual o biofilme é formado fique voltada para baixo e em contato com uma lamínula.

Alguns autores sugerem que a eficácia antimicrobiana de polímeros incorporados com materiais à base de prata está relacionada com a libertação de íons de prata ou AgNPs, outros relatam que o efeito inibitório é provavelmente devido ao contato direto entre os micro-organismos e o material (Wady et al., 2012). Isto pode explicar por que o grupo com 10% de vanadato foi mais sensível de maneira geral, quando comparado a outros.

Ao promover efeitos desejáveis em termos microbiológicos, a incorporação de agentes antimicrobianos na resina acrílica pode promover alterações indesejáveis em suas propriedades mecânicas e/ou físicas (Casemiro et al., 2008; Paleari et al., 2011). No entanto, no presente estudo foi utilizado um nanomaterial. A presença de ligações insaturadas na superfície dos nanomateriais faz com que eles apresentem uma energia livre de superfície elevada, o que também promove a ligação forte com outros materiais promovendo melhores propriedades físicas e mecânicas (Jandt; Sigusch, 2009). Assim, era de se esperar que, além de promover uma boa atividade antimicrobiana, as alterações das composições das resinas não reduzissem ou melhorassem as propriedades mecânicas.

Para avaliar esta hipótese, o desempenho mecânico foi avaliado, a fim de prever a durabilidade do material quando exposto às forças da cavidade oral, por meio de ensaios de dureza e rugosidade superficial, resistência à flexão, compressão e impacto.

No geral, existe uma correlação positiva entre o grau de conversão e a dureza dos polímeros (Faltermeier; Rosentritt; Müssig, 2007). Os resultados mostraram que a dureza superficial da resina autopolimerizável aumentou com a incorporação de 0,5% de vanadato de prata, sugerindo talvez uma interferência no grau de polimerização da resina testada, por outro lado, a dureza da resina termopolimerizável permaneceu inalterada.

Por sua vez, a rugosidade da superfície é associada com a formação de biofilme em próteses odontológicas (Regis et al., 2011). A presença de agentes antimicrobianos pode ser inútil se a resina acrílica testada for capaz de reter maiores quantidades de detritos, no entanto,

os valores encontrados neste estudo estavam perto de 0,2 μm , o que pode ser considerado como um valor abaixo do qual a aderência microbiana não é esperada (Bollen; Lambrechts; Quirynen, 1997).

A resistência à compressão da resina autopolimerizável não foi influenciada pela incorporação do nanomaterial enquanto que da termopolimerizável reduziu significativamente com a incorporação de 0,5% e 10%.

Tem sido afirmado que a resistência à flexão de quaisquer materiais polimerizados não deve ser inferior a 50 MPa (Iso, 2008). Com base nos valores de resistência à flexão obtidos, a incorporação de $\beta\text{-AgVO}_3$, em concentrações acima de 1% em peso, reduziram esta propriedade mecânica significativamente em relação ao grupo controle, sendo que a incorporação de 10% promoveu resultados abaixo daqueles exigidos pela norma citada, sendo a média de 48,03 MPa. Estes resultados são consistentes com os obtidos nos estudos de Shibata et al. (2007) e Sodagar et al. (2012) que ao adicionarem nanopartículas de prata às resinas acrílicas relataram que as mesmas podem atuar como impurezas na estrutura interna do material polimerizado.

Ainda, Sodagar et al. (2013) incorporaram nanopartículas de TiO_2 e SiO_2 na matriz de PMMA e também observaram que as nanopartículas podem afetar negativamente a resistência à flexão dos produtos finais, sendo este efeito diretamente relacionado com a concentração das nanopartículas uma vez que as mesmas podem afetar adversamente o grau de conversão, que por sua vez leva a um aumento no nível de monômero residual, que atua como plastificante (Shibata et al., 2007).

A resistência ao impacto também é uma propriedade desejável para resinas acrílicas por ser uma medida da energia necessária para iniciar e propagar uma fenda através do material. Assim, pode refletir a força de contato necessária para causar fratura em uma prótese em situação de queda acidental (Machado, 2012). Na literatura, enquanto alguns pesquisadores (Zappini et al., 2003; Uzun et al., 2002) utilizam amostras entalhadas, outros (Karacaer et al., 2003; Dikbas et al., 2013) preferem utilizar amostras não-entalhadas para avaliar os pontos fortes de impacto. Assim, considerando-se que a existência de entalhe pode configurar as tensões e ser um método difícil, demorado e não reprodutível (Memon; Yunus; Razzak, 2001; Meng; Latta, 2004), no presente estudo optou-se por utilizar amostras não-entalhadas.

Os resultados de resistência a impacto do presente estudo mostraram que a incorporação do $\beta\text{-AgVO}_3$ nas concentrações de 5 e 10% reduziram significativamente esta

propriedade quando comparou-se com o grupo controle. Assim, vale ressaltar que o teor de aditivos nanométricos é de importância crítica também para esta propriedade.

As imagens de MEV reforçam nossos resultados. Observa-se que conforme a fração de β -AgVO₃ é aumentada, começa haver no sistema formação de grandes aglomerados e uma segregação entre o nanomaterial e o polímero. Nota-se também que a presença de domínios de β -AgVO₃ ao longo da matriz segue um padrão circular, havendo um aumento no número de domínios nas resinas com maiores teores de β -AgVO₃, de forma que os mesmos atuem como um centro de estresse e afete negativamente as propriedades mecânicas do material polimerizado, principalmente aquelas que envolvem forças mais complexas, como é o caso da resistência à flexão (Han et al., 2008; Sodagar et al., 2012; Sodagar et al., 2013).

Esse padrão de distribuição pode ser explicado pelo fato de que ao se adicionar o β -AgVO₃ nanoestruturado à mistura para preparação da resina, ele se dispersa no monômero, ficando confinado em torno das partículas do polímero preexistente a medida que ocorre a polimerização do sistema. Uma vez que as partículas do polímero já existem, não há a possibilidade de ocorrer uma boa homogeneização entre ambos. Impedir aglomeração e melhorar a homogeneização tem sido um grande desafio na produção de nanocompósitos. Um melhor padrão de dispersão poderia ser obtido talvez com a utilização de um sonicador ou mesmo promover a solubilização das partículas do polímero antes de se adicionar o β -AgVO₃ de forma a não reduzir as propriedades mecânicas dos materiais e ampliar ainda mais as propriedades antimicrobianas devido a uma maior área de superfície.

Foram encontrados resultados significativos por meio da incorporação do β -AgVO₃ às resinas acrílicas, mostrando materiais com propriedades antimicrobianas frente aos principais micro-organismos associados aos problemas odontológicos. Porém, uma sugestão para continuidade do estudo em relação à parte microbiológica é investigar o efeito do β -AgVO₃ sobre comunidades complexas uma vez que a interação entre diferentes espécies poderia influenciar a formação de biofilme sobre as resinas verificando uma condição mais próxima aquela encontrada na cavidade bucal (Pereira-Cenci et al, 2008).

Além disso, estudos que visem promover uma maior homogeneidade entre o polímero e o nanomaterial podem potencializar o efeito antimicrobiano e levar a um melhor desempenho nas propriedades mecânicas das resinas. Porém, é importante ressaltar que embora algumas propriedades mecânicas avaliadas no presente estudo não se enquadrem nos níveis aceitáveis para utilização das resinas acrílicas na cavidade oral, não comprometem a sua utilização em outras aplicações como casquetes, moldeiras, guias cirúrgicos, além disso, a

associação do vanadato de prata pode ser realizada com diversos outros materiais como cimentos endodônticos, cimentos para cimentação de próteses, selantes de fôssulas e fissuras dentre outros, de forma que cada material necessitará de um grande estudo das propriedades físicas, químicas, mecânicas e biológicas e se comportará de forma diferente aos ensaios realizados.

Na literatura a citotoxicidade do vanadato de prata nanoestruturado frente ao bioindicador *Daphnia similis* (microcrustáceo) é relatada, sendo a mesma atribuída à prata e não ao vanádio (Artal et al., 2013) porém, este resultado não deve ser generalizado. Uma investigação a respeito da citotoxicidade do nanomaterial incorporado nas resinas acrílicas e frente a diferentes linhagens celulares é necessária uma vez que a biocompatibilidade está diretamente relacionada à concentração do nanomaterial utilizada.

Assim, apesar da necessidade de algumas modificações e realização de outros ensaios para viabilizar o uso das resinas acrílicas propostas deve-se considerar que este trabalho buscou responder ao estímulo de registro de patentes e títulos de proteção intelectual o que sabidamente colabora para o desenvolvimento tecnológico e científico do país.

7 Conclusões

Com base nos resultados obtidos pode-se concluir que:

1. O nanomaterial sintetizado foi o vanadato de prata nanoestruturado (β -AgVO₃).
2. A concentração inibitória mínima do nanomaterial contra micro-organismos específicos evidenciou a atividade do mesmo frente a *Candida albicans*, *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.
3. A incorporação de β -AgVO₃ foi capaz de promover atividade antimicrobiana às resinas acrílicas frente aos micro-organismos avaliados, sendo a concentração de 10% mais eficaz em termos microbiológicos.
4. A rugosidade superficial das resinas acrílicas não sofreu influência da incorporação do nanomaterial, porém concentrações acima de 1% reduziram a resistência à flexão. A incorporação de 5% e 10% do nanomaterial reduziu a resistência ao impacto das resinas.
5. A dureza da resina termopolimerizável permanece inalterada pela incorporação do nanomaterial e da autopolimerizável aumentou com 0,5%. Por outro lado, a resistência à compressão da resina autopolimerizável permaneceu inalterada e da termopolimerizável reduziu com a incorporação de 0,5% e 10%.
6. Observou-se que independente do teor incorporado sempre existe a presença de domínios de β -AgVO₃ ao longo da matriz seguindo um padrão circular.

8 Referências¹

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

ABE, Y., ISHII, M., TAKEUCHI, M., UESHIGE, M., TANAKA, S., AKAGAWA, Y. Effect of saliva on an antimicrobial tissue conditioner containing silver-zeolite. *Journal of oral rehabilitation*., v.31, n.6, p.568-573, 2004.

ACOSTA-TORRES, L.S., MENDIETA, I., NUÑEZ-ANITA, R.E., CAJERO-JUÁREZ, M., CASTAÑO, V.M. Cytocompatible antifungal acrylic resin containing silver nanoparticles for dentures. *Int J Nanomedicine*., v.7, p.4777-4786, 2012.

AGNELLI, P.B. Redução do biofilme de *Streptococcus mutans* sobre um material restaurador dentário modificado com nanopartículas de prata: estudo in vitro. 2011. 72 f, Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, São Carlos, 2011.

AGUIRRE, J.M., VERDUGO, F., ZAMACONA, J.M., QUINDOS, G., PONTON, J. Cytological changes in oral mucosa in denture stomatitis. *Gerodontology*., v.13, n.1, p.63-67, 1996.

ALCÂNTARA, C.S., MACÊDO, A.F., GURGEL, B.C., JORGE, J.H., NEPPELENBROEK, K.H., URBAN, V.M. Peel bond strength of resilient liner modified by the addition of antimicrobial agents to denture base acrylic resin. *J Appl Oral Sci*., v.20, n.6, p.607-612, 2012.

AL-DWAIRI, Z.N., AL-QURAN, F.A., AL-OMARI, O.Y. The effect of antifungal agents on surface properties of poly (methyl methacrylate) and its relation to adherence of *Candida albicans*. *J Prosthodont Res*., v.56, n.4, p.272-280, 2012.

ALLAKER, R.P. The use of nanoparticles to control oral biofilm formation. *Journal of Dental Research*., v.89, n.11, p.1175-1186, 2010.

ALT, V., BECHERT, T., STEINRUCKE, P., WAGENER, M., SEIDEL, P., DINGELDEIN, E., et al. An in vitro assessment of the antibacterial properties and cytotoxicity of nanoparticulate silver bone cement. *Biomaterials*., v.25, n.18, p.4383-4391, 2004.

AMIN, W.M., AL-ALI, M.H., SALIM, N.A., AL-TARAWNEH, S.K. A new form of intraoral delivery of antifungal drugs for the treatment of denture-induced oral candidosis. *Eur J Dent*., v.3, n.4, p.257-266, 2009.

AMMANN, T.W., BOSTANCI, N., BELIBASAKIS, G.N., THURNHEER, T. Validation of a quantitative real-time PCR assay and comparison with fluorescence microscopy and selective agar plate counting for species-specific quantification of an in vitro subgingival biofilm model. *Journal of periodontal research*., v. 48, n.4, p.517-526, 2013.

ANDRÉ, R.F., ANDRADE, I.M., SILVA-LOVATO, C.H., PARANHOS, H.F., PIMENTA, F.C., ITO, I.Y. Prevalence of *mutans streptococci* isolated from complete dentures and their susceptibility to mouthrinses. Braz Dent J., v.22, n.1, p.62-67, 2011.

ANTUNES, D.P., SALVIA, A.C., ARAÚJO, R.M., NICOLÓ, R.D., ITO, C.Y.K., ARAÚJO, M.A. Effect of green tea extract and mouthwash without alcohol on *Candida albicans* biofilm on acrylic resin. Gerodontology., 2014

ARAI, T., UEDA, T., SUGIYAMA, T., SAKURAI, K. Inhibiting microbial adhesion to denture base acrylic resin by titanium dioxide coating. Journal of Oral Rehabilitation., v.36, n.12, p.902-908, 2009.

ARTAL M.C., HOLTZ, R.D., KUMMROW, F., ALVES, O.L., UMBUZEIRO, G.A. The role of silver and vanadium release in the toxicity of silver vanadate nanowires toward *Daphnia similis*. Environ Toxicol Chem., v.32, n.4, p.908-912, 2013.

ASMUSSEN, E. Restorative resins: hardness and strength vs. quantity of remaining double bonds. Scandinavian Journal of Dental Research., v.90, n.6, p.484-489, 1982.

ASTM D695 -10 Standard Test Method for Compressive Properties of Rigid Plastics.

AYAZ, E.A., DURKAN, R. Influence of acrylamide monomer addition to the acrylic denture-base resins on mechanical and physical properties. Int J Oral Sci., v.5, n.4, p.229-235, 2013.

AYAZ, E.A., DURKAN, R., BAGIS, N. The effect of acrylamide incorporation on the thermal and physical properties of denture resins. J Adv Prosthodont., v.5, n.2, p.110-117, 2013.

BARBOSA, D.B., SOUZA, R.F., PERO, A.C., MARRA, J., COMPAGNONI, M.A. Flexural strength of acrylic resins polymerized by different cycles. J Appl Oral Sci., v.15, n.5, p.424-428, 2007.

BOLLEN, C.M., LAMBRECHTS, P., QUIRYNEN, M. Comparison of surface roughness of oral hard materials to the threshold surface roughness for bacterial plaque retention: a review of the literature. Dent Mater., v.13, n.4, p.258-269, 1997.

BORZABADI-FARAHANI, A., BORZABADI, E., LYNCH, E. Nanoparticles in orthodontics, a review of antimicrobial and anti-caries applications. Acta Odontol Scand., 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Condições de saúde bucal da população brasileira. Brasília, DF, 2005.

BRITO, A.C.R., COUTO, C.F., GOUVÊA, C.V.D. Avaliação comparativa da resistência à compressão entre uma resina composta direta e duas resinas laboratoriais. *Pesq Bras Odontoped Clin Integr.*, v.7, n.2, p.145-148, 2007.

BUENO, M., URBAN, V., BARBÉRIO, G., DA SILVA, W., PORTO, V., PINTO, L., NEPPELENBROEK, K. Effect of antimicrobial agents incorporated into resilient denture relines on the *Candida albicans* biofilm. *Oral Dis.*, v.12, 2013.

CARDOSO, B.C. Efeito de antifúngicos em suspensões e biofilmes de *Candida albicans* e *Candida dubliniensis*. Dissertação de Mestrado (Biotecnologia) Universidade do Minho, 2004.

CASEMIRO, L.A., MARTINS, C.H.G., PIRES-DE-SOUZA, F.C., PANZERI, H. Antimicrobial and mechanical properties of acrylic resins with incorporated silver-zinc zeolite-part I. *Gerodontology.*, v.25, n.3, p.187-194, 2008.

CHANG, H.H., CHENG, C.L., HUANG, P.J., LIN, S.Y. Application of scanning electron microscopy and X-ray microanalysis: FE-SEM, ESEM-EDS, and EDS mapping for studying the characteristics of topographical microstructure and elemental mapping of human cardiac calcified deposition. *Anal Bioanal Chem.*, v.406, n.1, p.359-366, 2014.

CHEN, X., SUWARNO, S.R., CHONG, T.H., MCDOUGALD, D., KJELLEBERG, S., COHEN, Y., et al. Dynamics of biofilm formation under different nutrient levels and the effect on biofouling of a reverse osmosis membrane system. *Biofouling.*, v.29, n.3, p.319-330, 2013.

CHENG, H., LI, Y., HUO, K., GAO, B., XIONG, W. Long-lasting in vivo and in vitro antibacterial ability of nanostructured titania coating incorporated with silver nanoparticles. *J Biomed Mater Res A.*, 2013.

CHENG, L., WEIR, M.D., ZHANG, K., WU, E.J., XU, S.M., ZHOU, X., XU, H.H. Dental plaque microcosm biofilm behavior on calcium phosphate nanocomposite with quaternary ammonium. *Dent Mater.*, v.28, n.8, p.853-862, 2012.

CHLADEK, G., MERTAS, A., BARSZCZEWSKA-RYBAREK, I., NALEWAJEK, T., ZMUDZKI, J., KRÓL, W., et al. Antifungal activity of denture soft lining material modified by silver nanoparticles – A pilot study. *J Mol Sci.*, v.12, n.7, p.4735-4744, 2011.

COENYE, T., PRIJCK, K., NAILIS, H., NELIS, H.J. Prevention of *Candida albicans* Biofilm Formation. The Open Mycology Journal., v.5, p.9-20, 2011.

COMPAGNONI, M.A., SOUZA, R.F., MARRA, J., PERO, A.C., BARBOSA, D.B. Relationship between *Candida* and nocturnal denture wear: quantitative study. Journal of oral rehabilitation., v.34, n.8, p.600-605, 2007.

CULLER, H.F. Formação de biofilme por *Escherichia coli* enteropatogênica atípica. Dissertação de Mestrado (Biotecnologia) Universidade de São Paulo 120f. 2010.

CUNHA, T.R., REGIS, R.R., BONATTI, M.R., SOUZA, R.F. Influence of incorporation of fluoroalkyl methacrylates on roughness and flexural strength of a denture base acrylic resin. J Appl Oral Sci., v.17, n.2, p.103-107, 2009.

DALL'ACQUA, L., BARICCO, M., BERTI, F., LIETTI, L., GIAMELLO, E. Spectroscopic and diffractometric study of the V2O5/TiO2 system prepared via mechanochemical activation. Journal of Materials Chemistry., v.8, n.6, p.1441-1446, 1998.

DALTOÉ, M.O., LEPRI, C.P., WIEZEL, J.G., TORNAVOI, D.C., AGNELLI, J.A.M., REIS, A.C. Analysis of the microstructure and mechanical performance of composite resins after accelerated artificial aging. Minerva Stomatol., v.62, n.3, p.63-69, 2013.

DHIR, G., BERZINS, D.W., DHURU, V.B., PERIATHAMBY, A.R., DENTINO, A. Physical properties of denture base resins potentially resistant to *Candida* adhesion. J Prosthodont., v.16, n. 6, p.465-472, 2007.

DIAZ-ARNOLD, A.M., VARGAS, M.A., SHAULL, K.L., LAFFOON, J.E., QIAN, F. Flexural and fatigue strengths of denture base resin. J Prosthet Dent., v.100, n.1, p.47-51, 2008.

DIKBAS, I., GURBUZ, O., UNALAN, F., KOKSAL, T. Impact strength of denture polymethyl methacrylate reinforced with different forms of E-glass fibers. Acta Odontol Scand., v.71, n. 3-4, p.727-732, 2013.

DO, T., DEVINE, D., MARSH, P.D. Oral biofilms: molecular analysis, challenges, and future prospects in dental diagnostics. Clin Cosmet Investing Dent., v.28, n.5, p.11-19, 2013.

DONG, C., ZHANG, F.Q. Effect of denture base materials on mRNA expression of the adhesion-associated genes from the *Streptococcus mutans* biofilms. J Oral Rehabil., v.36, n.12, p.894-901, 2009.

DONLAN, R.M. COSTERTON, J.W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganismos. Clin Microbiol Rev., v.15, n.2, p. 167-193, 2002.

FALTERMEIER, A., ROSENTRITT, M., MÜSSIG, D. Acrylic removable appliances: comparative evaluation of different postpolymerization methods. Am J Orthod Dentofacial Orthop., v.131, n.3, p. 301.e16-22. 2007.

FAN, C., CHU, L., RAWLS, H.R., NORLING, B.K., CARDENAS, H.L., WHANG, K. Development of an antimicrobial resin--a pilot study. Dent Mater., v.27, n.4, p.322-328, 2011.

FAOT, F., COSTA, M.A., CURY, A.A.D.B., GARCIA, R.C.R. Impact strength and fracture morphology of denture acrylic resins. J Prosthet Dent., v.96, n.5, p.367-373, 2006.

FENG, Q.L., WU, J., CHEN, G.Q., CUI, F.Z., KIM, T.N., KIM, J.O. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Journal of Biomedical Materials Research., v.52, n.4, p.662-668, 2000.

FLACH, N. Avaliação in vitro do efeito de diferentes soluções irrigadoras sobre o biofilme bacteriano: análise por meio da microscopia confocal. Trabalho de conclusão (Cirurgiã-dentista), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2010.

FORTES, C.B.B. Caracterização e propriedades das resinas acrílicas de uso odontológico – um enfoque voltado para a biossegurança. Tese de Doutorado (Ciências dos Materiais), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2007.

GJORGIEVSKA, E., APOSTOLSKA, S., DIMKOV, A., NICHOLSON, J.W., KAFTANDZIEVA, A. Incorporation of antimicrobial agents can be used to enhance the antibacterial effect of endodontics sealers. Dental Materials., v.29, n.3, p.e-29-e34, 2013.

GOBOR, T., COROL, G., FERREIRA, L.E.N., RYMOVICZ, A.U.M., ROSA, R.T., CAMPELO, P.M.S., ROSA, E.A.R. Proposal of protocols using D-glutamine to optimize the 2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl) – 5-[(phenylamino) carbonyl] – 2H- tetrazolium hydroxide (XTT) assay for indirect estimation of microbial loads in biofilms of medical importance. Journal of Microbiological Methods., v.84, p.299-306, 2011.

GOIATO, M.C., SANTOS, D.M., BAPTISTA, G.T., MORENO, A., ANDREOTTI, A.M., DEKON, S.F. Effect of thermal cycling and disinfection on microhardness of acrylic resin denture base. J Med Eng Technol., v.37, n.3, p.203-207, 2013.

GOUVÊA, C.V.D., COUTO, C.F., SOUZA, F.N., SALES, P.V.T., SILVE, L.E., BARROS, R.N. Study of the thermal cycling effect on the fracture strength of a nanoparticle composite resin and two microhybrid composite resins. *Odontologia Clín-Científ.*, v.7, n.4, p.321-324, 2008.

HAN, Y., KIAT-AMNUAY, S., POWERS, J.M., ZHAO, Y. Effect of nano-oxide concentration on the mechanical properties of a maxillofacial silicone elastomer. *J Prosthet Den.*, v.100, n.6, pp 465-473, 2008.

HANNIG, M., KRIENER, L., HOTH-HANNIG, W., BECKER-WILLINGER, C., SCHMIDT, H. Influence of nanocomposite surface coating on biofilm formation in situ. *J Nanosci Nanotechnol.*, v.7, n.12, p.4642-4648, 2007.

HE, X.Y., MEURMAN, J.H., KARI, K., RAUTERMAA, R., SAMARANAYAKE, L.P. In vitro adhesion of *Candida* species to denture base materials. *Mycoses.*, v.49, n.2., p. 80-84, 2006.

HOLTZ, R.D., LIMA, B.A., SOUZA FILHO, A.G., BROCCHI, M., ALVES, O.L. Nanostructured silver vanadate as a promising antibacterial additive to water-based paints. *Nanomedicine.*, v.8, n.6., p.935-940, 2012.

HOLTZ, R.D., SOUZA FILHO, A.G., BROCCHI, M., MARTINS, D., DURÁN, N., ALVES, O.L. Development of nanostructured silver vanadates decorated with silver nanoparticles as a novel antibacterial agent. *Nanotechnology.*, v.21, n.18: 185102, 2010.

HUH, J.B., LIM, Y., YOUN, H.I., CHANG, B.M., LEE, J.Y., SHIN, S.W. Effect of denture cleansers on *Candida albicans* biofilm formation over resilient liners. *J Adv Prosthodont.*, v.6, n.2, p.109-114, 2014.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. Dentistry, base polymers, part 1: denture base polymers. ISO 20795-1:2008.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. Dentistry: denture base polymers. ISO 1567:1998. Switzerland: ISO; 1998.

JACKSON, S., COULTHWAITE, L., LOEWY, Z., SCALLAN, A., VERRAN, J. Biofilm development by blastospores and hyphae of *Candida albicans* on abraded denture acrylic resin surfaces. *J Prosthet Dent* 2014.

JANDT, K.D., SIGUSCH, B.W. Future perspectives of resin-based dental materials. *Dent Mater.*, v.25, n.8, p.1001-1006, 2009.

JÚNIOR, A.M.J., FILHO, W.J.B. Apostila: Introdução à Microscopia Eletrônica de Varredura e Microanálise, 2005. 138 f. Laboratório de Caracterização Estrutural – Escola de Microscopia e Microanálise do Departamento de Engenharia de Materiais – Universidade Federal de São Carlos.

KANG, S.H., LEE, H.J., HONG, S.H., KIM, K.H., KWON, T.Y. Influence of surface characteristics on the adhesion of *Candida albicans* to various denture lining materials. *Acta odontologica Scandinavica.*, v.71, n.1, p.241-248, 2013.

KARACAER, O., POLAT, T.N., TEZVERGIL, A., LASSILA, L.V., VALLITTU, P.K. The effect of length and concentration of glass fibers on the mechanical properties of an injection- and a compression- molded denture base polymer. *J Prosthet Dent.*, v.90, n.4, p:385–393, 2003.

KAWAHARA, K., TSURUDA, K., MORISHITA, M., UCHIDA, M. Antibacterial effect of silver-zeolite on oral bacteria under anaerobic condition. *Dental Materials.*, v.16, n.6, p.452-455, 2000.

KHURANA, C., VALA, A.K., ANDHARIYA, N., PANDEY, O.P., CHUDASAMA, B. Antibacterial activity of silver: The role of hydrodynamic particle size at nanoscale. *J Biomed Mater Res A.*, 2013.

KRIMM, S., TOBOLSKY, A.V. Quantitative x-ray studies of order in amorphous and crystalline polymers. Quantitative x-ray determination of crystallinity in polyethylene. *J Polym Sci.*, v.7, n.1, p.57-76, 1951.

KUHAR, M., FUNDUK, N. Effects of polishing techniques on the surface roughness of acrylic denture base resins. *J Prosthet Dent.*, v.93, n.1, p.76-85, 2005.

KUHN, D.M., BALKIS, M., CHANDRA, J., MUKHERJEE, P.K., GHANNOUM, M.A. Uses and limitations of the XTT assay in studies of *Candida* growth and metabolism. *J Clin Microbiol.*, v.41, n.1, p.506-508, 2003.

KUHN, D.M., CHANDRA, J., MUKHERJEE, P.K., GHANNOUM, M.A. Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. *Infect Immun.*, v.70, n.2, p.878-888, 2002.

KUMAR, V., JOLIVALT, C., PULPYTEL, J., JAFARI, R., AREFI-KHONSARI, F. Development of silver nanoparticle loaded antibacterial polymer mesh using plasma polymerization process. *J Biomed Mater Res A.*, v.101, n.4, p.1121-1132, 2013.

KUROKI, K., HAYASHI, T., SATO, K., ASAI, T., OKANO, M., KOMINAMI, Y., TAKAHASHI, Y., KAWAI, T. Effect of self-cured acrylic resin added with an inorganic antibacterial agent on *Streptococcus mutans*. *Dent Mater J.*, v.29, n.3, p.277-285, 2010.

LIU, H.W., TANG, D.G. Synthesis of ZnV₂O₆ powder and its cathodic performance for lithium secondary battery. *Materials Chemistry and Physics.*, v.114, n.2-3, p.656-659, 2009.

MACHADO, A.L., PUCKETT, A.D., BREEDING, L.C., WADY, A.F., VERGANI, C.E. Effect of thermocycling on the flexural and impact strength of urethane-based and high-impact denture base resins. *Gerodontology.*, v.29, n.2, p.e318-323, 2012.

MARRA, J. Atividade antimicrobiana de uma resina acrílica para base protética combinada a um polímero antimicrobiano sobre a formação de biofilme. 2011. 103 f. Tese (Doutorado em Reabilitação Oral) - Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2011.

MARRA, J., PALEARI, A.G., RODRIGUEZ, L.S., LEITE, A.R., PERO, A.C., COMPAGNONI, M.A. Effect of and acrylic resin combined with and antimicrobial polymer on biofilm formation. *J Appl Oral Sci.*, v.20, n.6, p.643-648, 2012.

MEMON, M.S., YUNUS, N., RAZAK, A.A. Some mechanical properties of a highly cross-linked, microwave-polymerized, injection-molded denture base polymer. *Int J Prosthodont.*, v.14, n.3, p.214-218, 2001.

MENG, T.R.J., LATTA, M.A. Physical properties of four acrylic denture base resins. *J Contemp Dent Pract.*, v.6, n.4, p.93-100, 2005.

MONTEIRO, D.R., GORUP, L.F., TAKAMIYA, A.S., CAMARGO, E.R., FILHO, A.C., BARBOSA, D.B. Silver distribution and release from antimicrobial denture base resin containing silver colloidal nanoparticles. *Journal of Prosthodontics.*, v.21, n.1, p.7-15, 2012.

MONTEIRO, D.R., GORUP, L.F., TAKAMIYA, A.S., RUVOLLO-FILHO, A.C., CAMARGO, E.R., BARBOSA, D.B. The growing importance of materials that prevent microbial adhesion: antimicrobial effect of medical devices containing silver. *Int J Antimicrob Agents.*, v.34, n.2, p.103-110, 2009.

MONTERO, J., CASTILLO-OYAGÜE, R., LYNCH, C.D., ALBALADEJO, A., CASTAÑO, A. Self-perceived changes in oral health-related quality of life after receiving different types of conventional prosthetic treatments: a cohort follow-up study. *J Dent.*, v.41, n.6, p.493-503, 2013.

MOREIRA, R.S., NICO, L.S., TOMITA, N.E., RUIZ, T. A saúde bucal do idoso brasileiro: revisão sistemática sobre o quadro epidemiológico e acesso aos serviços de saúde bucal. *Cad. Saúde Pública.*, v.21, n.6, p. 1665-1675, 2005.

MORGAN, T.D., WILSON, M. The effects of surface roughness and type of denture acrylic on biofilm formation by *Streptococcus oralis* in a constant depth film fermentor. *J Appl Microbiol.*, v.91, n.1, p.47-53, 2001.

MORONES, J.R., ELECHIGUERRA, J.L., CAMACHO, A., HOLT, K., KOURI, J.B., RAMIREZ, J.T., et al. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology.*, v.16, n.10, p.2346-2353, 2005.

MOURA, J.S., SILVA, W.J., PEREIRA, T., CURY, A.A.D.B, GARCIA, R.C.R. Influence of acrylic resin polymerization methods and saliva on the adherence of four *Candida* species. *The Journal of prosthetic dentistry.*, v.96, n.3, p.205-211, 2006.

MUNHOZ, E.G.A., ABREU, C.W. Os fatores que influenciam na satisfação do paciente submetido a tratamento de prótese total convencional. *HU Revista, Juiz de Fora.*, v.37, n.4, p.413-419, 2011.

MUÑOZ-BONILLA, A., FERNÁNDEZ-GARCÍA, M. Polymeric materials with antimicrobial activity. *Prog Polym Sci.*, v.37, n.2, p.281-339, 2012.

MURAKAMI, N., WAKABAYASHI, N., MATSUSHIMA, R., KISHIDA, A., IGARASHI, Y. Effect of high-pressure polymerization on mechanical properties of PMMA denture base resin. *J Mech Behav Biomed Mater.*, v.20, p.98-104, 2013.

NIKAWA, H., HAMADA, T., YAMAMOTO, T. Denture plaque-past and recent concerns. *J Dent.*, v.26, n.4, p.299-304, 1998.

OHASHI, S., SAKU, S., YAMAMOTO, K. Antibacterial activity of silver inorganic agent YDA filler. *Journal of oral rehabilitation.*, v.31, n.4, p.364-367, 2004.

OMS (Organização Mundial da Saúde). Disponível em: <http://www.un.org/esa/socdev/ageing/index.html>. Acesso em: 31 de janeiro de 2014.

- ONODERA, K., KAWAGOE, T., SASAGURI, K., QUISMUNDO, C.P., SATO, S. The use of a bruxChecker in the evaluation of diferente grinding patterns during sleep bruxism. (Clinica report). Cranio: J Craniomandibular Pract., v.24, n.4, p.292-298, 2006.
- OZAK, S.T., OZKAN, P. Nanotechnology and dentistry. Eur J Dent., v.7, n.1, p.145-151, 2013.
- PALEARI, A.G., MARRA, J., PERO, A.C., RODRIGUEZ, L.S., RUVOLO-FILHO, S., COMPAGNONI, M.A. Effect of incorporation of 2-tert-butylaminoethyl methacrylate on flexural strength of a denture base acrylic resin. J Appl Oral Sci., v.19, n.3, p.195-199, 2011.
- PANZERI, H., LARA, E.H., PARANHOS, H.F., SILVA, C.H.L., GUGELMIN, M.C.S., TIRAPELLI, C., et al. In vitro and clinical evaluation of specific dentifrices for complete denture hygiene. Gerodontology., v.26, n.1, p.26-33, 2009.
- PARANHOS, H.F., SILVA-LOVATO, C.H., SOUZA, R.F., FREITAS-PONTES, K.M., WATANABE, E., ITO, I, Y. Effect of three methods for cleaning dentures on biofilms formed in vitro on acrylic resin. J Prosthodont., v.18, n.5, p.427-431, 2009.
- PARK, S.E., BLISSETT, R., SUSARLA, S.M., WEBER, H.P. *Candida albicans* adherence to surface-modified denture resin surfaces. J Prosthodont., v.17, n.5, p.365-369, 2008.
- PARK, S.E., CHAO, M., RAJ, P.A. Mechanical properties of surface-charged poly (methyl methacrylate) as denture resins. Int J Dent., 841431, 2009.
- PARK, S.E., PERIATHAMBY, A.R., LOZA, J.C. Effect of surface-charged poly (methyl methacrylate) on the adhesion of *Candida albicans*. J Prosthodont., v.12, n.4, p.249-254, 2003.
- PEETERS, E., NELIS, H.J., COENYE, T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. Journal of Microbiological Methods., v.72, n.2, p.157-165, 2008.
- PEREIRA-CENCI, T., DENG, D.M., KRANEVELD, E., MANDERS, E.M., DEL BEL CURY, A.A., TEN CATE, J.M., et al. The effect of *Streptococcus mutans* and *Candida glabrata* on *Candida albicans* biofilms formed on different surfaces. Archives of Oral Biology., v.53, n.8, p.755-764, 2008.

PERES, M.A., BARBATO, P.R., REIS, S.C., FREITAS, C.H., ANTUNES, J.L. Tooth loss in Brazil: analysis of the 2010 Brazilian Oral Health Survey Rev Saude Publica., v.47, n.3, p.78-89, 2013.

PESCI-BARDON, C., FOSSE, T., SERRE, D., MADINIER I. In vitro antiseptic properties of an ammonium compound combined with denture base acrylic resin. Gerodontology., v.23, n.2, p.111-116, 2006.

PIVA, E., BARBOSA, J.O., ROSSONI, R.D., VILELA, S.F.G., JORGE, A.O.C., JUNQUEIRA, J.C. Interação entre *Escherichia coli* e *Candida albicans* em biofilmes formados in vitro: análise da viabilidade celular por método colorimétrico. Rev Odontol UNESP., v.40, n.5, p.222-227, 2011.

QUEIROZ, J.R.C., FISSMER, S.F., KOGA-ITO, C.Y., SALVIA, A.C.R.D., MASSI, M., SOBRINHO, A.S.S., JÚNIOR, L.N. Effect of diamond-like carbon thin film coated acrylic resin on *Candida albicans* biofilm formation. J Prosthodont., v.22, n.6, p.451-455, 2013.

RAI, M., YADAY, A., GADE, A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. Biotechnology Advances., v.27, n.1., p.76-83, 2009.

RAJ, P.A., DENTINO, A.R. New phosphate poly (methyl methacrylate) polymers for the prevention of denture-induced microbial infection: an in vitro study. Clin Cosmet Investig Dent., v.3, p.25-32, 2011.

RAMAGE, G., TOMSETT, K., WICKES, B.L., LOPEZ-RIBOT, J.L., REDDING, S.W. Denture stomatitis: a role for *Candida* biofilms. Oral surgery, oral medicina, oral pathodology, oral radiology, and endodontics., v.98, n.1, p.53-59, 2004.

REDDING, S., BHATT, B., RAWLS, H.R., SIEGEL, G., SCOTT, K., LOPEZ-RIBOT, J. Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation on denture material. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, v.107, n.5, p.669-672, 2009.

REGIS, R.R., DELLA VECCHIA, M.P., PIZZOLITTO, A.C., COMPAGNONI, M.A., SOUZA, R.P., DE SOUZA, R.F. Antimicrobial properties and cytotoxicity of an antimicrobial monomer for application in prosthodontics. J Prosthodont., v.21, n.4, p.283-290, 2012.

REGIS, R.R., ZANINI, A.P., DELLA VECCHIA, M.P., SILVA-LOVATO, C.H., PARANHOS, H.F.O., SOUZA, R.F. Physical properties of an acrylic resin after incorporation of an antimicrobial monomer. J Prosthodont., v.20, n.5, p.372-379, 2011.

REIS, A.C., DE CASTRO, D.T., SCHIAVON, M.A., DA SILVA, L.J., AGNELLI, J.A.M. Microstructure and mechanical properties of composite resins subjected to accelerated artificial aging. *Braz Dent J.*, v.24, n.6, p.599-604, 2013.

RODRIGUEZ, L.S., PALEARI, A.G., GIRO, G., JUNIOR, N.M.O, PERO, A.C., COMPAGNONI, M.A. Chemical characterization and flexural strength of a denture base acrylic resin with monomer 2-tert-butylaminoethyl metachrylate. *J Prosthodont.*, v.22, n.4, p.292-297, 2013.

RUEGGEBERG, F.A., CRAIG, R.G. Correlation of parameters used to estimate monomer conversion in a light-cured composite. *Journal of Dental Research.*, v.67, n.6, p.932-937, 1988.

RUPP, M.E., FITZGERALD, T., MARION, N., HELGET, V., PUUMALA, S., ANDERSON, J.R., et al. Effect of silver –coated urinary catheters: efficacy, cost-effectiveness, and antimicrobial resistance. *American Journal of Infection Control.*, v.32, n.8, p.445-450, 2004.

SAMIEI, M., AGHAZADEH, M., LOTFI, M., SHAKOEI, S., AGHAZADEH, Z., PAKDEL, S.M.V. Antimicrobial efficacy of mineral trioxide aggregate with and without silver nanoparticles. *Iran Endod J.*, v.8, n.4, p.166-170, 2013.

SANTOS, R.L., PITHON, M.M., CARVALHO, F.G., RAMOS, A.A, ROMANOS, M.T. Mechanical and biological properties of acrylic resins manipulated and polished by different methods. *Braz Dent J.*, v.24, n.5, p.492-497, 2013.

SATO, M., OHSHIMA, T., MAEDA, N., OHKUBO, C. Inhibitory effect of coated mannan against the adhesion of *Candida* biofilms to denture base resin. *Dent Mater J.*, v.32, n.3, p.355-60, 2013.

SCHAULE, G., FLEMMING, H.C., RIDGWAY, H.F. Use of 5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride for quantifying planktonic and sessile respiring bacteria in drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.59, n.11, p.3850-3857, 1993.

SCHIERHOLTZ, J.M., LUCAS, L.J., RUMP, A., PULVERER, G. Efficacy of silver-coated medical devices. *Journal of Hospital Infection.*, v.40, n.4, p.257-262, 1998.

SHAMELI, K., AHMAD, M.B., ZARGAR, M., YUNUS, W.M., RUSTAIYAN, A., IBRAHIM, N.A. Synthesis of silver nanoparticles in montmorillonite and their antibacterial behavior. *International Journal of Nanomedicine.*, v.6, p.581-590, 2011.

SHEN, Y., QIAN, W., CHUNG, C., OLSEN, I., HAAPASALO, M. Evaluation of the effect of two chlorhexidine preparations on biofilm bacteria in vitro: a three-dimensional quantitative analysis. *J Endod.*, v.35, n.7, p.981-985, 2009.

SHIBATA, T., HAMADA, N., KIMOTO, K., SAWADA, T., SAWADA, T., KUMADA, H., et al. Antifungal effect of acrylic resin containing apatite-coated TiO₂ photocatalyst. *Dent Mater J.*, v.26, n.3, p.437-444, 2007.

SILVA, E.F.A., SOUZA, M.L.R. Autopercepção da saúde bucal e satisfação com a vida em mulheres idosas usuárias de prótese total. *Revista de Odontologia da Universidade Cidade de São Paulo, São Paulo.*, v.18, n.1, p.61-65, 2006.

SILVA, P.M.B. Efeito antimicrobiano das soluções desinfetantes sobre biofilmes de *C. albicans* em resinas acrílicas termopolimerizáveis. Dissertação (Mestrado em Reabilitação Oral), Faculdade de Odontologia de Bauru, 140 p. 2009.

SILVA, W.J., SENEVIRATNE, J., PARAHITIYAWA, N., ROSA, E.A., SAMARANAYAKE, L.P., DEL BEL CURY, A.A. Improvement of XTT assay performance for studies involving *Candida albicans* biofilms. *Braz Dent J.*, v.19, n.4, p.364-369, 2008.

SIVAKUMAR, I., ARUNACHALAM, K.S., SAJJAN, S., RAMARAJU, A.V., RAO, B., KARAMAJ, B. Incorporation of antimicrobial macromolecules in acrylic denture base resins: A research composition and update. *J Prosthodont.*, 2013.

SKUPIEN, J.A., VALENTINI, F., BOSCATO, N., PEREIRA-CENCI, T. Prevention and treatment of *Candida* colonization on denture liners: a systematic review. *The Journal of Prosthetic Dentistry.*, v.110, n.5, p.356-362, 2013.

SODAGAR, A., BAHADOR, A., KHALIL, S., SHAHROUDI, A.S., KASSAEE, M.Z. The effect of TiO₂ and SiO₂ nanoparticles on flexural strength of poly (methyl methacrylate) acrylic resins. *J Prosthodont Res.*, v.57, n.1, p.15-19, 2013.

SODAGAR, A., KASSAEE, M.Z., AKHAVAN, A., JAVADI, N., ARAB, S., KHARAZIFARD, M.J. Effect of silver nano particles on flexural strength of acrylic resins. *J Prosthodont Res.*, v. 56, n.2, p.120-124, 2012.

STRAIOTO, F.G., FILHO, A.P.R., NETO, A.J.F., CURY, A.A.D.B. Polytetrafluorethylene added to acrylic resins: mechanical properties. *Braz Dent J.*, v.21, n.1, p.55-59, 2010.

TAKAHASHI, N., IWASA, F., INOUE, Y., MORISAKI, H., ISHIHARA, K., BABA K. Evaluation of the durability and antiadhesive action of 2-methacryoyloxy ethyl phosphory. The Journal of Prosthetic Dentistry., 2014.

TAYLOR, A.R. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. Prim Care., v.40, p. 637-654, 2013.

THEIN, Z.M., SAMARANAYAKE, Y.H., SAMARANAYAKE, L.P. Effect of oral bacteria on growth and survival of *Candida albicans* biofilms. Arch Oral Biol., v.51, n.8, p.672-680, 2006.

TORNAVOI, D.C., AGNELLI, J.A., LEPRI, C.P., MAZZETTO, M.O., BOTELHO, A.L., SOARES, R.G., et al. Assessment of surface hardness of acrylic resins submitted to accelerated artificial aging. Minerva Stomatol., v.61, n.6, p.283-288, 2012.

URBAN, V.M., SEÓ, R.S., GIANNINI, M., ARRAIS, C.A. Superficial distribution and identification of antifungal/antimicrobial agents on a modified tissue conditioner by SEM-EDS Microanalysis: A preliminary study. J Prosthodont., v.18, n.7, p.603-610, 2009.

UZUN, G., HERSEK, N. Comparison of the fracture resistance of six denture base acrylic resins. J Biomater App., v.17, n.1, p.19-29, 2002.

VALENTINI, F., LUZ, M.S., BOSCATO, N., PEREIRA-CENCI, T. Biofilm formation on denture liners in a randomised controlled in situ trial. Journal of Dentistry., v.41, n.5, p.420-427, 2013.

WADY, A.F., MACHADO, A.L., VERGANI, C.E., PAVARINA, A.C., GIAMPAOLO, E.T. Impact strength of denture base and relined acrylic resins subjected to long-term water immersion. Braz Dent J., v.22, n.1, p.56-61, 2011.

WADY, A.F., MACHADO, A.L., ZUCOLOTTI, V., ZAMPERINI, C.A., BERNI, E., VERGANI, C.E. Evaluation of *Candida albicans* adhesion and biofilm formation on a denture base acrylic resin containing silver nanoparticles. Journal of applied microbiology., v.112, n.6, p.1163-1172, 2012.

WEBB, B.C., THOMAS, C.J., WILLCOX, M.D., HARTY, D.W., KNOX, K.W. *Candida*-associated denture stomatitis. A etiology and management: a review. Part 3. Treatment of oral candidosis. Aust Dent J., v.43, n.4, p.244-249, 1998.

YAMAMOTO, K., OHASHI, S., AONO, M., KOKUBO, T., YAMADA, I., YAMAUCHI, J. Antibacterial activity of silver ions implanted in SiO₂ filler on oral streptococci. *Dental Materials.*, v.12, n.4, p.227-229, 1996.

YAMANAKA, M., HARA, K., KUDO, J. Bactericidal actions of a silver ion solution on *Escherichia coli*, studied by energy-filtering transmission electron microscopy and proteomic analysis. *Applied and Environmental Microbiology.*, v.7, n.11, p.7589-7593, 2005.

YILDIRIM-BICER, A.Z., PELER, I., AKCA, G., CELIK, I. In vitro antifungal evaluation of seven different disinfectants on acrylic resins. *Biomed Res Int.*, 519098, 2014.

YOSHIIJIMA, Y., MURAKAMI, K., KAYAMA, S., LIU, D., HIROTA, K., ICHIKAWA, T., et al. Effect of substrate surface hydrophobicity on the adherence of yeast and hyphal *Candida*. *Mycoses.*, v.53, n.3, p.221-226, 2010.

YU, R.Y., ZHOU, Y.S., FENG, H.L., LIU, X.Y. Silver-ion release and particle distribution of denture base resin containing nanometer-sized silver –supported antimicrobial agent. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi.*, v.43, n.1, p.54-56, 2008.

ZAPATA, R.O., BRAMANTE, C.M., MORAES, I.G., BERNARDINELI, N., GASPAROTO, T.H., GRAEFF, M.S., et al. Confocal laser scanning microscopy is appropriate to detect viability of *Enterococcus faecalis* in infected dentin. *J Endod.*, v.34, n.10, p.1198-1201, 2008.

ZAPPINI, G., KAMMANN, A., WACHTER, W. Comparison of fracture tests of denture base materials. *J Prosthet Dent.*, v.90, n.6, p.578–585, 2003.

9 Apêndice

9.1 Apêndice A

Tabela A1. XTT (valor da absorbância) dos 4 micro-organismos avaliados para cada grupo incorporado com vanadato de prata nanoestruturado

Grupos	Resina Autopolimerizável				Resina Termopolimerizável			
	<i>C. albicans</i>	<i>S. mutans</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>	<i>S. mutans</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Controle								
C1	0,079	0,095	0,089	0,116	0,102	0,116	0,077	0,122
C2	0,082	0,115	0,098	0,108	0,252	0,202	0,076	0,113
C3	0,084	0,180	0,083	0,145	0,079	0,109	0,091	0,138
C4	0,074	0,236	0,073	0,134	0,068	0,126	0,103	0,131
C5	0,075	0,211	0,086	0,206	0,064	0,284	0,091	0,126
C6	0,070	0,796	0,071	0,204	0,082	0,610	0,078	0,133
C7	0,075	0,590	0,072	0,395	0,122	1,225	0,093	0,195
C8	0,069	0,070	0,071	0,280	0,072	0,728	0,080	0,209
Média	0,076	0,286	0,080	0,198	0,105	0,425	0,086	0,145
(DP)	(0,005)	(0,263)	(0,010)	(0,098)	(0,062)	(0,400)	(0,009)	(0,035)
0,5%								
C1	0,072	0,180	0,093	0,103	0,079	0,096	0,074	0,139
C2	0,074	0,094	0,085	0,110	0,091	0,082	0,077	0,137
C3	0,072	0,137	0,087	0,105	0,071	0,090	0,070	0,142
C4	0,064	0,600	0,073	0,142	0,069	0,577	0,073	0,121
C5	0,080	1,133	0,084	0,133	0,067	1,091	0,079	0,075
C6	0,075	0,081	0,083	0,260	0,078	0,191	0,081	0,126
C7	0,072	1,296	0,070	0,604	0,065	0,173	0,084	0,185
C8	0,069	0,095	0,075	0,213	0,068	0,125	0,076	0,203
Média	0,072	0,452	0,081	0,208	0,073	0,303	0,076	0,141
(DP)	(0,004)	(0,502)	(0,007)	(0,169)	(0,008)	(0,357)	(0,004)	(0,039)
1%								
C1	0,061	0,498	0,097	0,090	0,103	0,083	0,074	0,096
C2	0,065	0,120	0,179	0,083	0,068	0,090	0,078	0,097
C3	0,068	0,116	0,083	0,096	0,071	0,079	0,077	0,088
C4	0,072	0,117	0,074	0,144	0,066	0,314	0,079	0,079
C5	0,075	0,633	0,066	0,167	0,065	0,098	0,071	0,129
C6	0,065	0,088	0,072	0,265	0,066	0,242	0,074	0,122
C7	0,071	0,457	0,072	0,216	0,064	0,218	0,076	0,140
C8	0,071	0,420	0,072	0,578	0,076	0,161	0,081	0,178
Média	0,068	0,306	0,089	0,204	0,072	0,160	0,076	0,116
(DP)	(0,004)	(0,218)	(0,037)	(0,163)	(0,012)	(0,088)	(0,003)	(0,032)
2,5%								
C1	0,070	0,086	0,122	0,118	0,102	0,091	0,065	0,090
C2	0,064	0,082	0,099	0,093	0,066	0,240	0,061	0,080
C3	0,057	0,114	0,079	0,170	0,065	0,092	0,062	0,075
C4	0,071	0,108	0,075	0,114	0,061	0,464	0,073	0,093
C5	0,068	0,096	0,077	0,075	0,066	0,456	0,077	0,083
C6	0,074	0,418	0,068	0,136	0,067	0,112	0,071	0,085
C7	0,080	0,100	0,075	0,160	0,067	0,179	0,074	0,124

C8	0,076	1,225	0,074	0,421	0,071	0,341	0,078	0,082
Média	0,070	0,278	0,083	0,160	0,070	0,246	0,070	0,089
(DP)	(0,007)	(0,398)	(0,017)	(0,109)	(0,012)	(0,156)	(0,006)	(0,015)
5%								
C1	0,073	0,413	0,059	0,062	0,058	0,080	0,069	0,065
C2	0,058	0,082	0,069	0,057	0,057	0,077	0,072	0,070
C3	0,065	0,115	0,077	0,066	0,067	0,069	0,063	0,060
C4	0,087	0,426	0,073	0,061	0,065	0,077	0,087	0,067
C5	0,079	0,073	0,075	0,065	0,058	0,290	0,102	0,069
C6	0,067	0,611	0,071	0,061	0,062	0,074	0,069	0,065
C7	0,095	0,070	0,086	0,070	0,066	0,371	0,072	0,075
C8	0,058	0,077	0,071	0,071	0,061	0,210	0,069	0,078
Média	0,072	0,233	0,072	0,064	0,061	0,156	0,075	0,068
(DP)	(0,013)	(0,215)	(0,007)	(0,004)	(0,003)	(0,119)	(0,012)	(0,005)
10%								
C1	0,063	0,066	0,064	0,062	0,063	0,058	0,062	0,058
C2	0,050	0,073	0,082	0,060	0,056	0,067	0,092	0,064
C3	0,060	0,070	0,072	0,061	0,071	0,068	0,068	0,057
C4	0,067	0,068	0,075	0,058	0,060	0,062	0,068	0,075
C5	0,061	0,082	0,068	0,066	0,067	0,059	0,069	0,069
C6	0,075	0,063	0,063	0,058	0,064	0,064	0,075	0,070
C7	0,064	0,053	0,065	0,067	0,055	0,059	0,065	0,077
C8	0,062	0,053	0,070	0,067	0,051	0,067	0,078	0,077
Média	0,062	0,066	0,069	0,062	0,060	0,063	0,072	0,068
(DP)	(0,007)	(0,009)	(0,006)	(0,003)	(0,006)	(0,004)	(0,009)	(0,008)

9.2 Apêndice B

Tabela B1. UFC/mL (em log) dos 4 micro-organismos avaliados para cada grupo incorporado com vanadato de prata nanoestruturado

Grupos	Resina Autopolimerizável				Resina Termopolimerizável			
	<i>C. albicans</i>	<i>S. mutans</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>	<i>S. mutans</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Controle								
C1	4,093	5,589	6,292	7,079	4,121	5,246	6,134	7,079
C2	3,901	5,643	6,318	7,079	5,265	7,079	5,850	7,079
C3	4,137	5,809	5,615	7,079	4,265	6,029	6,817	7,079
C4	3,505	5,602	6,611	7,079	4,435	5,000	6,458	6,093
C5	4,079	6,723	6,465	7,526	3,301	6,225	4,590	6,146
C6	3,301	5,932	5,663	6,380	4,301	7,109	4,334	6,193
C7	3,748	5,489	5,760	8,079	4,772	5,742	4,806	6,536
C8	4,373	5,663	5,944	8,079	4,631	5,575	4,494	6,342
Média	3,892	5,806	6,083	7,297	4,386	6,000	5,435	6,568
(DP)	(0,355)	(0,395)	(0,385)	(0,574)	(0,567)	(0,780)	(0,987)	(0,443)
0,5%								
C1	3,973	5,966	5,912	7,079	4,204	5,905	5,745	7,079
C2	3,516	6,301	6,623	7,079	4,542	5,619	6,120	7,079
C3	3,542	7,079	6,292	7,079	4,000	5,982	5,571	7,079
C4	3,881	5,872	3,380	7,631	3,079	5,465	6,000	6,483
C5	4,982	5,121	5,494	6,121	3,079	5,551	5,850	6,784
C6	3,748	5,093	6,064	6,667	2,903	5,365	5,910	6,521
C7	4,401	5,477	3,079	8,079	3,857	5,745	6,027	8,079
C8	3,944	5,107	6,428	8,079	3,681	5,754	5,526	7,885
Média	3,998	5,752	5,409	7,226	3,668	5,673	5,843	7,123
(DP)	(0,485)	(0,701)	(1,390)	(0,677)	(0,594)	(0,212)	(0,215)	(0,583)
1%								
C1	3,760	7,079	5,566	7,079	4,798	5,365	3,739	7,079
C2	3,948	6,049	5,905	7,079	4,611	5,602	6,520	7,079
C3	3,899	5,754	5,702	7,079	4,274	5,598	6,310	7,079
C4	4,435	5,619	5,494	7,107	3,556	6,500	6,387	5,748
C5	3,881	5,435	6,342	7,852	3,505	4,310	5,236	6,932
C6	2,903	4,292	5,702	8,079	3,301	2,964	5,571	6,869
C7	4,193	5,827	5,571	7,674	3,556	6,920	6,422	7,848
C8	4,049	4,754	5,521	7,922	3,778	6,193	5,435	6,960
Média	3,883	5,601	5,725	7,483	3,922	5,431	5,702	6,949
(DP)	(0,448)	(0,838)	(0,282)	(0,439)	(0,562)	(1,273)	(0,940)	(0,574)
2,5%								
C1	4,215	2,924	6,049	7,079	4,784	5,292	6,033	7,079
C2	4,146	1,602	5,914	6,760	3,631	3,477	4,830	5,547
C3	3,920	3,292	5,987	7,079	3,843	4,079	4,283	7,079
C4	3,602	0,000	5,134	7,674	3,447	0,000	3,982	6,551
C5	4,134	0,000	4,301	7,401	3,505	3,204	4,803	7,890
C6	3,944	2,079	5,571	7,453	3,602	0,000	4,706	5,526

C7	3,556	2,079	4,916	8,079	4,033	0,000	4,593	6,584
C8	3,881	3,812	5,049	7,547	3,447	5,408	4,561	7,274
Média	3,924	1,973	5,365	7,384	3,786	2,682	4,723	6,691
(DP)	(0,244)	(1,412)	(0,619)	(0,409)	(0,451)	(2,350)	(0,600)	(0,825)
5%								
C1	3,812	3,769	4,107	0,000	3,775	0,000	0,000	4,012
C2	3,678	1,602	1,602	0,000	3,674	0,000	1,600	2,982
C3	4,146	2,380	0,000	0,000	3,531	0,000	1,602	0,000
C4	4,627	0,000	0,000	0,000	2,556	0,000	3,966	0,000
C5	4,415	0,000	0,000	0,000	3,107	0,000	3,265	0,000
C6	2,982	0,000	0,000	0,000	2,602	0,000	0,000	0,000
C7	4,408	2,447	0,000	1,602	3,602	0,000	3,033	0,000
C8	4,170	0,000	2,602	0,000	3,778	1,602	4,049	0,000
Média	4,029	1,274	1,038	0,200	3,328	0,200	2,189	0,874
(DP)	(0,527)	(1,484)	(1,584)	(0,566)	(0,508)	(0,566)	(1,637)	(1,642)
10%								
C1	0,000	1,602	0,000	0,000	4,072	0,000	1,602	0,000
C2	2,204	0,000	0,000	0,000	3,551	0,000	0,000	0,000
C3	0,000	2,380	0,000	0,000	4,827	0,000	1,602	0,000
C4	4,301	0,000	1,602	0,000	2,556	2,602	3,182	3,593
C5	2,079	0,000	1,602	0,000	0,000	0,000	3,598	3,350
C6	2,556	0,000	0,000	0,000	1,602	0,000	2,748	4,380
C7	4,134	0,000	1,602	0,000	0,000	0,000	3,093	0,000
C8	2,903	0,000	3,204	0,000	0,000	0,000	3,584	0,000
Média	2,272	0,497	1,001	0,000	2,076	0,325	2,426	1,415
(DP)	(1,622)	(0,944)	(1,191)	(0,000)	(1,968)	(0,919)	(1,258)	(1,974)

9.3 Apêndice C

Tabela C1. Médias aritméticas das três leituras de dureza superficial Knoop (HK) realizadas em cada espécime da resina autopolimerizável

	Controle	0,5%	1%	2,5%	5%	10%
CP1	14,9	31,8	21,7	13,4	20,3	13,8
CP2	15,6	20,4	18,6	18,0	17,0	17,2
CP3	18,3	21,1	21,5	19,5	18,5	18,1
CP4	18,2	29,9	18,9	15,9	17,2	14,3
CP5	16,4	30,3	17,5	18,6	15,0	16,8
CP6	18,0	22,6	18,4	18,3	16,2	13,7
CP7	16,3	22,5	19,2	17,3	19,2	14,2
CP8	14,8	20,4	18,1	21,4	15,4	16,0
CP9	15,2	29,5	18,4	18,2	14,8	15,2
CP10	21,1	32,9	20,0	17,9	16,9	17,2
Média	16,88	26,14	19,23	17,85	17,05	15,65
(DP)	(2,00)	(5,13)	(1,41)	(2,11)	(1,82)	(1,61)

Tabela C2. Médias aritméticas das três leituras de dureza superficial Knoop (HK) realizadas em cada espécime da resina termopolimerizável

	Controle	0,5%	1%	2,5%	5%	10%
CP1	17,1	20,6	19,8	19,9	17,0	22,9
CP2	15,7	19,0	19,3	14,4	15,3	18,0
CP3	18,7	17,1	18,5	19,1	15,3	19,5
CP4	17,1	18,0	18,3	17,4	19,0	19,6
CP5	15,6	15,5	17,0	17,2	17,5	19,2
CP6	17,3	18,6	15,2	17,9	17,6	18,1
CP7	16,1	20,8	20,0	20,4	22,4	18,0
CP8	16,6	16,7	17,0	17,9	20,1	18,9
CP9	15,3	19,7	18,3	18,6	15,4	16,1
CP10	16,4	12,4	17,0	15,7	19,1	14,5
Média	16,62	17,87	18,06	17,88	17,89	18,51
(DP)	(1,01)	(2,55)	(1,50)	(1,82)	(2,33)	(2,21)

9.4 Apêndice D

Tabela D1. Resistência à flexão de cada espécime da resina autopolimerizável (MPa)

	Controle	0,5%	1%	2,5%	5%	10%
CP1	72.45	84.63	73.98	70.29	49.17	36.73
CP2	72.43	68.08	85.04	64.89	56.22	46.52
CP3	74.67	75.09	88.12	67.56	53.85	47.29
CP4	69.32	86.83	81.73	60.42	41.38	55.39
CP5	72.54	90.33	77.90	73.56	52.28	55.51
CP6	82.56	81.31	71.31	62.43	43.28	50.36
CP7	65.03	82.22	72.80	58.05	43.21	47.50
CP8	80.12	67.60	80.10	77.35	48.35	38.87
CP9	71.19	91.31	88.93	67.30	58.42	43.25
CP10	78.07	69.95	85.62	58.19	54.94	52.22
Média	73.83	79.73	80.55	66.00	50.11	47.36
(DP)	(5.21)	(9.00)	(6.41)	(6.47)	(5.98)	(6.37)

Tabela D2. Resistência à flexão de cada espécime da resina termopolimerizável (MPa)

	Controle	0,5%	1%	2,5%	5%	10%
CP1	81.81	92.30	67.25	60.01	59.17	53.63
CP2	84.54	88.02	58.38	80.25	46.25	53.93
CP3	83.38	84.53	78.96	75.78	59.40	49.22
CP4	84.87	79.47	91.83	95.10	50.39	44.24
CP5	85.78	63.59	65.24	46.00	47.65	52.60
CP6	82.14	70.34	81.71	61.20	52.80	45.82
CP7	70.99	87.37	50.53	75.63	50.82	48.55
CP8	47.96	71.30	87.09	59.33	57.84	53.10
CP9	95.28	75.86	59.22	77.34	60.11	38.68
CP10	84.17	97.19	86.63	69.19	43.43	47.34
Média	80.09	80.99	72.68	69.98	52.78	48.71
(DP)	(12.71)	(10.70)	(14.34)	(13.83)	(6.05)	(4.90)

9.5 Apêndice E

Tabela E1. Resistência à compressão de cada espécime da resina autopolimerizável (MPa)

	Controle	0,5%	1%	2,5%	5%	10%
CP1	111,89	127,53	92,96	105,55	104,78	112,14
CP2	104,61	124,17	106,63	104,21	107,06	96,18
CP3	111,49	128,01	105,61	101,79	94,49	101,45
CP4	93,20	119,52	106,90	113,40	103,08	102,28
CP5	92,72	117,88	97,87	114,82	86,62	105,10
CP6	109,64	118,10	109,74	113,43	113,13	104,48
CP7	109,64	115,47	92,31	117,35	104,45	91,13
CP8	88,02	115,20	95,72	118,21	99,32	93,95
CP9	105,07	117,80	97,52	118,23	100,69	105,93
CP10	109,64	109,80	91,45	108,78	87,48	123,90
Média	103,59	119,34	99,67	111,57	100,11	103,65
(DP)	(8,89)	(5,72)	(6,89)	(6,08)	(8,44)	(9,44)

Tabela E2. Resistência à compressão de cada espécime da resina termopolimerizável (MPa)

	Controle	0,5%	1%	2,5%	5%	10%
CP1	77,10	56,93	76,44	59,00	67,55	57,30
CP2	69,90	60,79	67,83	75,82	61,92	58,55
CP3	77,23	54,77	63,17	64,31	61,82	61,56
CP4	82,03	47,50	51,68	59,04	58,67	47,18
CP5	72,20	41,19	59,57	69,51	54,00	58,01
CP6	73,02	35,10	61,31	71,43	53,37	46,22
CP7	59,85	51,68	59,00	60,14	78,32	32,93
CP8	72,20	49,54	45,77	73,87	63,92	62,51
CP9	73,02	43,87	72,92	60,61	62,07	47,33
CP10	78,27	51,81	70,82	65,28	66,97	56,26
Média	73,48	49,31	62,85	65,90	62,86	52,78
(DP)	(6,01)	(7,69)	(9,53)	(6,36)	(7,20)	(9,20)

9.6 Apêndice F

Tabela F1. Média aritmética das três leituras de rugosidade superficial (μm) realizadas em cada espécime da resina autopolimerizável

	Controle	0,5%	1%	2,5%	5%	10%
CP1	0,37	0,11	0,20	0,14	0,16	0,70
CP2	0,12	0,33	0,34	0,29	0,74	0,13
CP3	0,78	0,20	0,15	0,15	0,12	0,10
CP4	0,24	1,98	0,21	0,12	0,12	0,20
CP5	0,80	0,22	1,90	0,90	0,32	0,08
CP6	0,28	0,12	0,11	0,10	0,23	0,08
CP7	0,31	0,25	0,37	0,07	0,08	0,11
CP8	0,09	0,22	0,13	0,22	0,10	0,11
CP9	0,32	0,19	0,12	0,70	0,11	0,14
CP10	0,22	0,17	0,19	0,11	0,19	0,15
Média	0,35	0,37	0,37	0,28	0,21	0,18
(DP)	(0,24)	(0,56)	(0,54)	(0,28)	(0,19)	(0,18)

Tabela F2. Média aritmética das três leituras de rugosidade superficial (μm) realizadas em cada espécime da resina termopolimerizável

	Controle	0,5%	1%	2,5%	5%	10%
CP1	0,56	0,11	0,08	0,07	0,10	0,22
CP2	0,90	0,11	0,09	0,20	0,08	0,12
CP3	0,07	0,06	0,05	0,52	0,06	0,17
CP4	0,09	0,07	0,06	0,16	0,11	0,62
CP5	0,07	0,12	1,10	0,06	0,08	0,19
CP6	0,07	0,11	0,09	0,06	0,10	0,07
CP7	0,06	0,99	0,11	0,10	0,07	0,11
CP8	0,08	0,15	0,08	0,10	0,09	0,08
CP9	0,06	0,08	0,09	0,15	0,06	0,45
CP10	0,06	0,09	0,11	0,08	0,09	0,11
Média	0,20	0,18	0,18	0,15	0,08	0,21
(DP)	(0,28)	(0,28)	(0,32)	(0,13)	(0,01)	(0,18)

9.7 Apêndice G

Tabela G1. Resistência ao impacto (J/m) da resina autopolimerizável

	Controle	5%	10%
CP1	154	72	44
CP2	149	75	46
CP3	156	74	60
CP4	157	75	57
CP5	150	70	58
CP6	168	74	55
CP7	145	63	47
CP8	172	70	49
CP9	169	66	45
CP10	157	67	50
Média	157,70	70,60	51,10
(DP)	(9,14)	(4,16)	(5,89)

Tabela G2. Resistência ao impacto (J/m) da resina termopolimerizável

	Controle	5%	10%
CP1	166	72	47
CP2	169	78	50
CP3	175	69	50
CP4	166	59	56
CP5	190	75	55
CP6	209	63	64
CP7	156	72	50
CP8	154	63	50
CP9	181	59	63
CP10	181	69	50
Média	174,70	67,90	53,50
(DP)	(16,50)	(6,62)	(5,89)

9.8 Apêndice H

Figura H1. Placas de Petri representativas das sementeiras de *Candida albicans* – Resina Autopolimerizável

Figura H2. Placas de Petri representativas das sementeiras de *Candida albicans* – Resina Termopolimerizável

Figura H3. Placas de Petri representativas das sementeiras de *Streptococcus mutans* – Resina Autopolimerizável

Figura H4. Placas de Petri representativas das sementeiras de *Streptococcus mutans* – Resina Termopolimerizável

Figura H5. Placas de Petri representativas das semeaduras de *Staphylococcus aureus* – Resina Autopolimerizável

Figura H6. Placas de Petri representativas das semeaduras de *Staphylococcus aureus* – Resina Termopolimerizável

Figura H7. Placas de Petri representativas das sementeiras de *Pseudomonas aeruginosa* – Resina Autopolimerizável

Figura H8. Placas de Petri representativas das sementeiras de *Pseudomonas aeruginosa* – Resina Termopolimerizável